

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

Máster en Ingeniería Química

LOS RESIDUOS DE CERVEZA COMO FUENTE DE ANTIOXIDANTES NATURALES



Memoria y Anexos

Autor: Martín García Paz
Director: María Pilar Almajano Pablos
Convocatoria: Octubre 2017

Resumen

El bagazo de malta es el principal residuo de la industria cervecera, y actualmente no se consigue de él casi ningún valor. En el presente trabajo se estudia la posibilidad de extraer sustancias con actividad antirradicalaria a partir de este subproducto. Para ello se analizan un total de seis muestras procedentes de la producción de cerveza, tanto industrial como artesanal.

Se han caracterizado las muestras en su contenido en glucosa, proteínas y cenizas. La muestra más rica en proteínas es el bagazo Damm 100P con un total de $24,562 \pm 1,132$ mg/g muestra húmeda, así como un 2,94% de peso en cenizas. No se han hallado trazas de glucosa en ningún caso.

Se ha llevado a cabo una optimización del proceso de extracción, consiguiéndose los mejores resultados en cuanto a contenido en polifenoles totales y actividad antirradicalaria utilizando una disolución de hidróxido sódico al 1,45% (w/v) a 80 °C. Los extractos se han analizado mediante los métodos Folin-Ciocalteu, ABTS y ORAC. La muestra con mayor contenido en polifenoles totales es el bagazo de Estrella Galicia ($38,833 \pm 2,973$ μ mol GAE/g muestra húmeda). El bagazo de Malta Artesana presenta la mayor actividad antirradicalaria según el método ORAC ($188,614 \pm 11,96$ μ mol TE/g muestra húmeda) y según el método ABTS ($90,509 \pm 6,412$ μ mol TE/g muestra húmeda).

Los extractos obtenidos se han aplicado a la elaboración de films de ácido poliláctico y se ha estudiado su capacidad antioxidante en carne de ternera (sin efecto) y emulsiones de aceite en agua (reduciendo su oxidación tras 14 días en un 97%).

Se ha cuantificado mediante HPLC el contenido en ácido ferúlico de las diferentes muestras, obteniéndose la concentración más elevada para el bagazo Damm AB ($290,887 \pm 10,146$ mg/100 g muestra seca).

El bagazo de malta puede ser, por tanto, una importante fuente de antioxidantes naturales. La obtención de su extracto es viable y proporciona un valor añadido a lo que actualmente es sólo un residuo orgánico. Se puede aplicar en forma de extracto o liofilizado en la industria alimentaria. Se ha abierto un amplio camino, en el que se debe profundizar, en la investigación de procedimientos de extracción.

Resum

El bagàs de malta és el principal residu de la indústria cervesera i actualment no s'aconsegueix d'ell gairebé cap valor. En el present treball s'estudia la possibilitat d'extreure substàncies amb activitat antirradicalària a partir del subproducte bagàs de malta. Per això s'analitzen un total de sis mostres procedents de la producció de cervesa, tant industrial com artesanal.

S'han caracteritzat les mostres en el seu contingut en glucosa, proteïnes i cendres. La mostra més rica en proteïnes és el bagàs Damm 100P amb un total de $24,562 \pm 1,132$ mg / g mostra fresca. Aquesta té un contingut del 2,94% de pes en cendres. No s'han trobat traces de glucosa en cap cas.

S'ha dut a terme una optimització del procés d'extracció, aconseguint els millors resultats de polifenols totals i activitat antirradicalària amb una dissolució d'hidròxid sòdic al 1,45% (w / v) a 80 °C. Els extractes s'han analitzat mitjançant els mètodes Folin-Ciocalteu, ABTS i ORAC. La mostra amb major contingut en polifenols totals és el bagàs d'Estrella Galícia ($38,833 \pm 2,973$ mmol GAE / g mostra fresca). El bagàs de Malta Artesana presenta la major activitat antirradicalària pel mètode ORAC ($188,614 \pm 11,96$ mmol ET / g mostra fresca) i segons el mètode ABTS ($90,509 \pm 6,412$ mmol ET / g mostra fresca).

Els extractes obtinguts s'han aplicat a l'elaboració de films d'àcid polilàctic i s'ha estudiat la seva capacitat antioxidant en carn de vedella (sense efecte) i emulsions d'oli en aigua (reduint la seva oxidació després de 14 dies en un 97%).

S'ha quantificat mitjançant HPLC el contingut en àcid ferúlic de les diferents mostres, obtenint-se la concentració més elevada per al bagàs Damm AB ($290,887 \pm 10,146$ mg / 100 g mostra seca).

El bagàs de malta pot ser, per tant, una important font d'antioxidants naturals. L'obtenció del seu extracte és viable i proporciona un valor afegit al que actualment és només un residu orgànic. Es pot aplicar en forma d'extracte o liofilitzat en productes de la indústria alimentària. S'ha obert un ampli camí, en el qual s'ha de d'aprofundir, en la investigació de procediments d'extracció.

Abstract

Brewer's spent grain is the main waste from beer manufacture, and little or no value is currently obtained from it. In this project, the extraction of substances with radical-scavenging capability from this by-product is considered. With this aim, a total of 6 brewing samples are analyzed, both industrial and craft.

Samples have been characterized by their glucose, protein and ashes content. Damm 100P has the highest amount of protein ($24,562 \pm 1,132$ mg/g wet sample) and ashes (2,94% w/w). No glucose was found on any sample.

Extraction process has been optimized. Regarding total polyphenol content and radical-scavenging capability, best results were obtained with a 1,45% (w/v) sodium hydroxide solution at 80 °C. Extracts were analyzed by Folin-Ciocalteu, ABTS and ORAC assays. Estrella Galicia is the sample with the highest total polyphenol content ($38,833 \pm 2,973$ μ mol GAE/g wet sample). Malta Artesana has the highest radical-scavenging by both ORAC ($188,614 \pm 11,96$ μ mol TE/g wet sample) and ABTS assays ($90,509 \pm 6,412$ μ mol TE/g wet sample).

Extracts were used on PLA films, and their antioxidant capability has been studied on beef meat (no effect) and oil-on-water emulsions (oxidation reduced by 97% after 14 days).

Ferulic acid content has been quantified by HPLC. Highest result was obtained for Damm AB ($290,887 \pm 10,146$ mg/100 g dry sample).

Brewer's spent grains could be an important source of natural antioxidants. Extraction process is viable and provides added value to what currently is only an organic waste. This product can be applied as an extract or freeze-dried into the food industry. However, a deeper study about the extraction methods should be carried before.

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a mi tutora María Pilar los conocimientos que me ha transmitido y la paciencia que me ha dedicado durante estos meses, así como su esmero por hacer las cosas cada día un poco mejor.

También agradecer a mis compañeros de laboratorio por su inestimable ayuda y compañía: Camila, Angels, Meri, Juliana, Manel, Angels, Martí y Nacho. Y a Pili, Sara y Gaby por enseñarme lo necesario para aplicar las distintas técnicas necesarias para completar este trabajo.

A mis compañeros de clase y de piso, por ser un apoyo necesario durante estos años como estudiante.

Finalmente, agradecer a mi familia, pareja y amigos por estar siempre a mi lado durante el tiempo que he pasado en Barcelona. Pese a lo difícil que pueda ser a veces la distancia, ellos han hecho que parezca mucho menor.

Glosario

BSG: *Brewer's Spent Malt*

TPC: *Total Phenolic Content*

TE: *Trolox Equivalents*

GAE: *Gallic Acid Equivalents*

ORAC: *Oxygen Radical Activity Capacity*

NTU: *Nephelometric Turbidity Unit*

EBC: *European Brewery Convention*

EBU: *European Bitterness Units*

IBU: *International Bitterness Units*

RSM: *Response Surface Methodology*



Índex

RESUMEN	I
ABSTRACT	III
AGRADECIMIENTOS	IV
GLOSARIO	V
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Objetivos	11
2. MARCO TEÓRICO	12
2.1. La cerveza y sus materias primas.....	12
2.1.1. Malta.....	12
2.1.2. Agua	13
2.1.3. Lúpulo	17
2.1.4. Levadura	22
2.2. Proceso de producción	25
2.2.1. Limpieza y pretratamiento	25
2.2.2. Molienda.....	25
2.2.3. Macerado.....	25
2.2.4. Cocción	28
2.2.5. Whirlpool	28
2.2.6. Fermentación	29
2.2.7. Maduración	30
2.3. Oxidación y antioxidantes.....	31
2.3.1. Mecanismos de oxidación	31
2.3.2. Compuestos fenólicos	32
2.3.3. Antioxidantes en la malta de cebada	33
2.3.4. Antioxidantes en el bagazo de malta	35
3. MATERIALES Y MÉTODOS	39
3.1. Muestras	39
3.1.1. Bagazo.....	39
3.1.2. Carne.....	40
3.2. Métodos	40
3.2.1. Elaboración de extractos	40

3.2.2.	Diseño experimental para la optimización de extractos.....	41
3.2.3.	Caracterización de muestras	43
3.2.4.	Emulsiones	43
3.2.5.	Preparación de hamburguesas	45
3.2.6.	Ensayos de determinación de capacidad antirradicalaria.....	45
3.2.7.	Análisis mediante HPLC-DAD	49
3.2.8.	Elaboración de films.....	50
3.2.9.	Análisis estadístico	52
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
4.1.	Caracterización de muestras	53
4.1.1.	Proteína total	53
4.1.2.	Glucosa total	54
4.1.3.	Cenizas.....	54
4.2.	Determinación del disolvente óptimo	55
4.3.	Determinación de las condiciones óptimas de extracción	56
4.3.1.	RSM Folin-Ciocalteu	56
4.3.2.	RSM ABTS.....	60
4.3.3.	RSM ORAC	63
4.4.	Determinación de capacidad antioxidante	66
4.4.1.	Contenido fenólico Folin-Ciocalteu	66
4.4.2.	ABTS	67
4.4.3.	ORAC	68
4.5.	Pruebas de oxidación de emulsiones	69
4.6.	Pruebas de oxidación con carne.....	71
4.7.	Ensayos de difusividad con films	71
4.8.	Análisis mediante HPLC-DAD.....	71
4.8.1.	Modificaciones del método cromatográfico	72
4.8.2.	Cuantificación de ácido ferúlico.....	78
4.9.	Correlaciones	78
5.	ANÁLISIS DE IMPACTO AMBIENTAL	81
	CONCLUSIONES	82
	PRESUPUESTO	85
	Material fungible	85
	Material básico de laboratorio	86

Equipos e instrumentos	87
Reactivos	88
Consumo de agua	89
Consumo eléctrico	89
Coste de personal	90
Coste total	90
BIBLIOGRAFIA	91
ANEXO A. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	95
A1. Determinación del disolvente óptimo	95
A2. Análisis de superficie de respuesta – Folin-Ciocalteu	96
A3. Análisis de superficie de respuesta – ABTS	98
A4. Análisis de superficie de respuesta – ORAC	101
A6. Determinación del contenido fenólico – Folin-Ciocalteu	103
A7. Determinación de la actividad antioxidante – ABTS	104
A8. Determinación de la actividad antioxidante – ORAC	105
A9. Emulsiones	106
A10. Proteínas	108
A11. Cuantificación de ácido ferúlico	109
ANEXO B. RECTAS DE CALIBRADO	111
B1. Folin-Ciocalteu	111
B2. ABTS	111
B3. ORAC	112
B4. Ácido ferúlico	112
B5. Proteínas	113



1. Introducción

La industria cervecera se engloba dentro de las actividades del sector alimentario que parten de materias primas de origen vegetal. Estas se caracterizan por la generación de gran cantidad de residuos vegetales. Actualmente, existe un interés creciente por el aprovechamiento de estos subproductos, de forma que dejen de ser una carga para las empresas y se conviertan en una fuente de valor.

A través de este trabajo, se busca evaluar la posibilidad de extraer compuestos con propiedades antirradicalarias a partir del bagazo de malta, principal residuo de la industria cervecera. Hoy en día, este bagazo se cede a agricultores locales para el abono de campos de cultivo, o bien para la elaboración de piensos para la industria ganadera.

1.1. Objetivos

1. Realizar una revisión bibliográfica del proceso de producción de cerveza, así como de la actividad antioxidante de la malta de cebada y su bagazo.
2. Obtener el contenido en proteínas, glucosa y cenizas del bagazo de malta.
3. Comparar el efecto de diferentes disolventes y condiciones de extracción, con la finalidad de optimizar la extracción de los principios bioactivos del bagazo de malta, medidos como polifenoles totales y actividad antirradicalaria.
4. Analizar el contenido en polifenoles totales y la actividad antirradicalaria en muestras de diferentes orígenes, tanto industrial como artesanal.
5. Aplicar el bagazo de malta, sus extractos y films elaborados a partir de estos, a modelos alimentarios de carne de ternera y emulsiones de aceite en agua, analizando su efecto sobre el proceso oxidativo.
6. Cuantificar compuestos fenólicos presentes en el bagazo de malta mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

2. Marco teórico

2.1. La cerveza y sus materias primas

La cerveza es la quinta bebida más consumida en el mundo, además de la primera dentro de las bebidas alcohólicas. En 2014, se procesaron un total de 189.060 millones de litros (Kirin Beer University Report 2015).

Las primeras evidencias de su producción se remontan a la época mesopotámica, 7.000 años atrás. A lo largo de la historia, la cerveza se ha elaborado sin tener una comprensión de los mecanismos de la fermentación, hasta el descubrimiento de los microorganismos y la acción de la levadura.

Los ingredientes básicos en la elaboración de cerveza son la malta, el agua, el lúpulo y la levadura. Cada uno de estos elementos tiene una importancia notable en el producto final, que se detallará en los siguientes apartados.

2.1.1. Malta

La malta de cebada es la base de la cerveza, ya que es la fuente de azúcares fermentables, así como de proteínas, enzimas y taninos. Otros cereales (trigo, avena, centeno, arroz) también se pueden utilizar en proporción variable. Los azúcares contenidos en la malta se encuentran en forma de almidón, que deben ser procesados a través de las distintas enzimas contenidas en el grano de cebada, una vez sean activadas mediante la humedad y el calor.

La malta más utilizada es la “malta base”, que representa como mínimo el 70% del contenido en cereal de la cerveza. Se trata de cebada malteada sin un proceso de tostado adicional. Sin embargo, es común añadir otras variedades como las maltas tostadas o caramelizadas, o incluso maltas de otros cereales como el trigo o el centeno. La razón es la búsqueda de distintas características organolépticas deseables.

2.1.1.1. El malteado

El proceso de malteado se lleva a cabo en tres etapas. En primer lugar, el grano de cebada se limpia y se trasvasa a los tanques de remojado, en los que el cereal se cubre con agua. Durante 48 horas la malta se escurre y sumerge alternativamente, con el objetivo de aumentar el contenido en humedad del 12% al 44%.

Tras humedecerse, los granos empiezan a germinar, lo cual puede apreciarse visualmente a través de la aparición de un pequeño brote. La germinación inicia una serie de procesos químicos en el interior del grano que se conocen como “modificación”. Las reservas de almidón se abren y se liberan las enzimas que lo transformarán en carbohidratos simples. Esta etapa del malteado se realiza en salas especialmente acondicionadas, mediante el uso de aire humidificado a una temperatura regulada. El cereal se remueve para evitar el apelmazamiento y conseguir una modificación uniforme a lo largo de 4-5 días.

Finalmente, la germinación se detiene mediante el secado en hornos rotatorios a 85 °C durante 1-2 horas. De esta manera, se elimina la humedad, lo que detiene la transformación del almidón en azúcares simples y permite el almacenamiento de la malta. Si el proceso de secado se lleva a cabo a mayor temperatura o durante más tiempo, se obtienen los granos tostados utilizados en la elaboración de cervezas negras o tostadas.

Un caso particular son las maltas caramelizadas, utilizadas en pequeñas proporciones (5-10%) para añadir cuerpo y color, por su contenido aromático, y su capacidad de aumentar la duración de la espuma. En este caso, la malta se calienta a 66-77 °C durante unas horas mientras sigue húmeda. Esto permite una conversión parcial del almidón. Al tostar el cereal a temperaturas elevadas (120 °C) comparado con la malta base, los azúcares recién formados se caramelizan, volviéndose no fermentables pero aportando nuevas características a la cerveza.

Para describir la intensidad del color de la malta, así como de la cerveza, se utilizan las unidades de color EBC (*European Brewery Convention*). Este parámetro se calcula como la absorbancia a 430 nm, multiplicado por 25 (o 12,7 para las unidades SRM, *Standard Reference Method*).

2.1.2. Agua

En la cerveza, el agua cumple múltiples roles: es el medio en el que se producen el macerado y la fermentación, cuyo rendimiento dependerá de sus características y contenido en minerales; y al mismo tiempo es una parte esencial del producto final. Por lo tanto, el uso de un agua con unas propiedades adecuadas es vital en la elaboración de cerveza.

2.1.2.1. Parámetros óptimos del agua de elaboración (*brewing water*)

El agua utilizada en el proceso es importante por su contenido en iones, particularmente el calcio y los hidrogenocarbonatos. El calcio, dentro de un rango aceptable (50-150 ppm) favorece el crecimiento y desarrollo de la levadura. Se puede añadir al agua empleada en forma de sulfato de calcio (CaSO₄) o cloruro de calcio (CaCl₂), aumentando el primero el aroma a lúpulo y el segundo el carácter de malta de la cerveza.

Es especialmente importante la presencia de calcio y magnesio durante el macerado, ya que favorece la acción de las enzimas que descomponen el almidón (especialmente las α -amilasas) mediante dos mecanismos: disminuyendo el pH hasta el rango óptimo de actividad, y actuando como cofactor de estas enzimas (Eumann y Schildbach 2012). Estos dos minerales siguen siendo relevantes en etapas posteriores, contribuyendo a la precipitación de proteínas y oxalatos, que son responsables de la aparición de turbidez y de *gushing* (liberación repentina de espuma al abrir la cerveza).

En cuanto a los hidrogenocarbonatos, su función es amortiguar la acidificación causada por la malta. Al capturar H^+ del medio, dan lugar a ácido carbónico (H_2CO_3), que debido al calor del macerado libera CO_2 al aire. Con esto se produce una pérdida neta de acidez. La siguiente fórmula, desarrollada por Kolbach, permite determinar la alcalinidad residual: un valor positivo indica un pH más alcalino en el macerado que si se emplease agua destilada, y a la inversa.

$$RA = TA - \frac{Ca^{2+} + \frac{Mg^{2+}}{2}}{3,5} \quad (\text{Eq. 2.1})$$

En donde RA es la alcalinidad residual y TA la alcalinidad total. Tanto estos parámetros como las concentraciones de calcio y magnesio se expresan como dureza en ppm de $CaCO_3$.

Sobre el resto de iones y compuestos presentes en el agua, se ha de tener cuidado con los niveles de cloruros (<50 ppm) para evitar problemas de corrosión, así como de nitratos (<25 ppm NO_3^-) ya que pueden dificultar el proceso de fermentación. Las sustancias altamente oxidantes, como el cloro y el ozono, deben eliminarse para evitar la aparición de sabores desagradables (por la formación de clorofenoles) y la oxidación prematura de la cerveza.

Tabla 1. Parámetros recomendados para el agua en la elaboración de cerveza (Eumann y Schildbach 2012).

Parámetro	Valor recomendado
Fe (ppm)	<0,1
Mn (ppm)	<0,05
Turbidez (NTU ¹)	0,0 – 0,5
Ca ²⁺ (ppm)	80 (70 – 90)
Mg ²⁺ (ppm)	0 – 10
Na ⁺ (ppm)	0 – 20
Alcalinidad total (ppm CaCO ₃)	25 (10 – 50)
Alcalinidad residual Kolbach (ppm CaCO ₃)	<0
Cl ⁻ (ppm)	0 – 50
SO ₄ ²⁻ (ppm)	100 (30 – 150)
NO ₃ ⁻ (ppm)	0 – 25
NO ₂ ⁻ (ppm)	0,0 – 0,1
KMnO ₄ (ppm O ₂ L ⁻¹)	<5
pH	5,0 – 9,5
SiO ₂ (ppm)	0 – 25
Trihalometanos (ppb)	<10
H ₂ S total (ppb)	<5

1. NTU, Unidad Nefelométrica de Turbidez.

2.1.2.2. Pretratamiento del agua de planta

En general, en una planta de producción de cerveza, el agua utilizada proviene de manantiales o acuíferos (agua subterránea). Sin embargo, también es común el uso de lagos, ríos y embalses (agua superficial) o bien de agua de la red municipal. En todos los casos, se ha de someter a un tratamiento previo a su uso en la planta.

El primer paso es el filtrado para eliminar la presencia de partículas y turbidez, seguido de un proceso de desinfección. Suelen utilizarse filtros de arena o multicapa en conjunto con desinfectantes como el ClO_2^- . En el caso de alta contaminación microbiológica, como en el agua superficial, se recomienda el uso de membranas de ultrafiltración por su capacidad de actuar como barrera frente a bacterias, parásitos y virus.

Una vez realizada la desinfección, se procede a eliminar el cloro y sus derivados (principalmente trihalometanos) que se han generado debido a los agentes desinfectantes. A continuación, se desmineraliza el agua mediante distintas técnicas, como el uso de membranas de ósmosis inversa (RO) o intercambio iónico (IX).

Para los distintos usos dentro de la planta de producción, se trabajará con agua de diferentes características. Las propiedades idóneas del agua de elaboración ya se han descrito en el apartado anterior. En cuanto al agua de dilución, que se usa para ajustar la cerveza hasta la concentración deseada de alcohol, debe someterse a un proceso de “desaireación” (eliminación de los gases disueltos) (<10 ppb O_2 disuelto) para evitar la oxidación del producto.

En cuanto al agua de servicio, utilizada en la limpieza de botellas y equipos, y el agua de calderas, el objetivo principal es reducir al mínimo la dureza del agua para evitar la corrosión. En el caso del agua de calderas se lleva a cabo también una “desaireación” térmica para eliminar el O_2 y CO_2 disueltos.

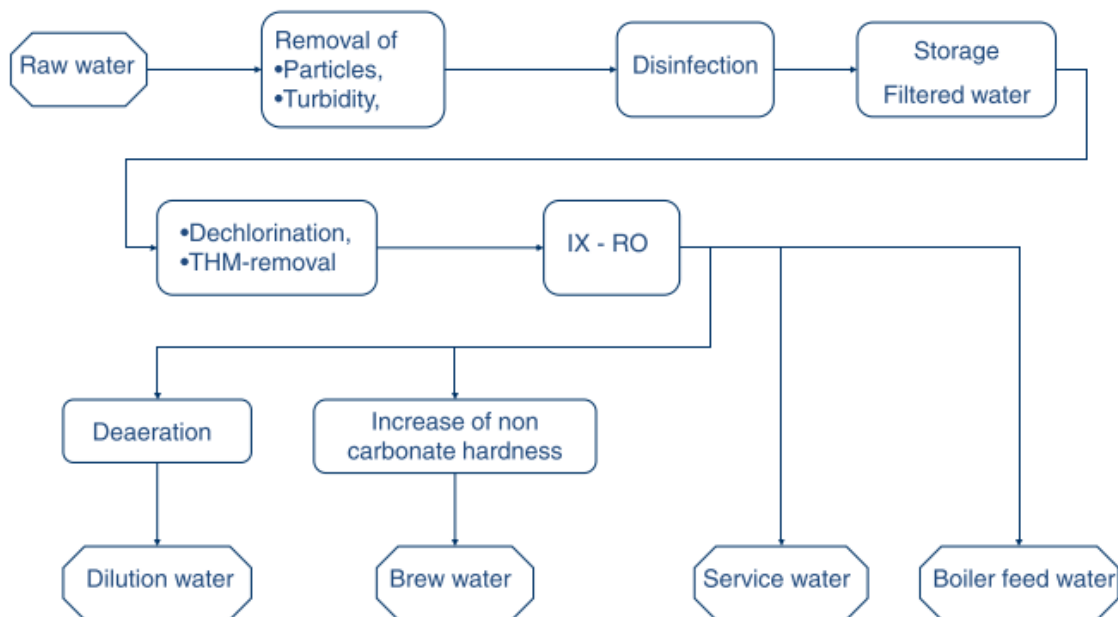


Figura 1. Esquema genérico del tratamiento de aguas de una planta de producción de cerveza (Eumann y Schildbach 2012).

2.1.3. Lúpulo

El lúpulo (*Humulus lupulus*) es una enredadera que crece cerca de zonas húmedas. Se recolectan sus flores, que son ricas en diversos componentes, siendo los más importantes las humulonas y los aceites esenciales. Otros componentes presentes son proteínas, taninos y polifenoles.

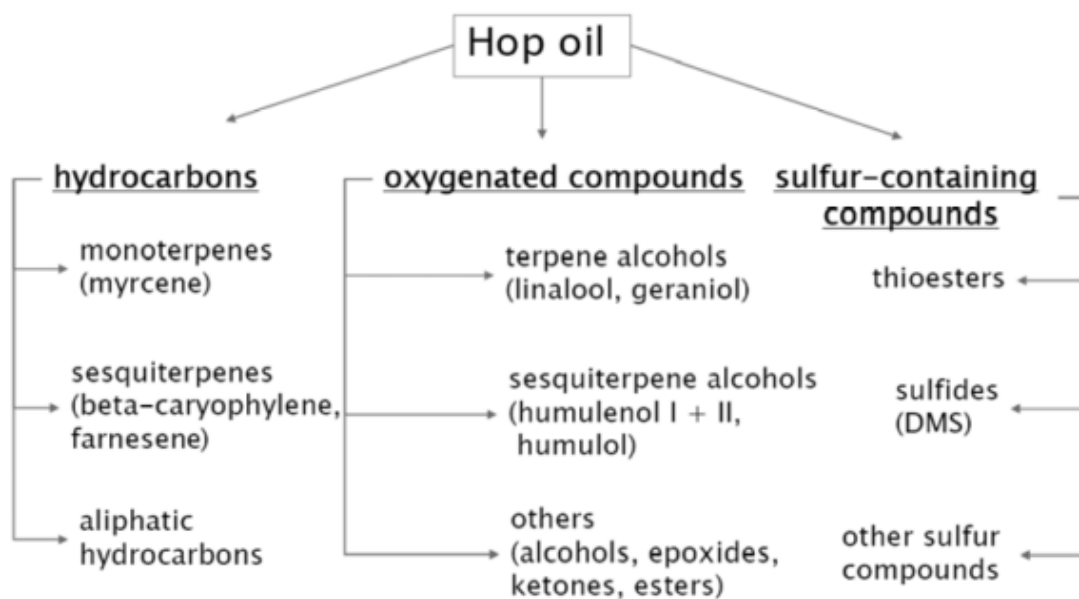


Figura 2. Clasificación de los componentes del aceite de lúpulo (Schönberger y Kosteletzky 2011).

2.1.3.1. Amargor

Las humulonas o alfa-ácidos son los principales responsables del amargor característico de la cerveza. Estos compuestos no tienen un sabor amargo de por sí, pero al hervirse durante un período de tiempo superior a la media hora se isomerizan dando lugar a sustancias conocidas como isohumulonas. Por el contrario, las humulonas que no llegan a isomerizarse no alcanzan el umbral de percepción excepto en las variedades de cerveza que incluyen adiciones tardías de lúpulo, lo cual es típico en las cervezas artesanales.

Dentro de las isohumulonas, se ha demostrado que los distintos isómeros presentan distintos umbrales de amargor, siendo las formas *cis* más amargas que las *trans*. Otros compuestos que influyen en la percepción del amargor son los beta-ácidos (cohulupona, ácido hulupínico,...), aunque su influencia es mucho menor que la de los alfa-ácidos y hasta hace relativamente poco se consideraba que se perdían durante el hervido.

Por último, cabe destacar el papel de los polifenoles en el amargor de la cerveza. A pesar de la dificultad de describir su efecto en detalle debido a la gran diversidad de polifenoles existentes, se conoce su interacción con los iso-alfa-ácidos, incrementando la intensidad y duración del amargor. En elevadas concentraciones (>200 mg/L) dan lugar a sabores astringentes que pueden resultar desagradables.

2.1.3.2. Medida del amargor

Para determinar el amargor de la cerveza de forma cuantitativa, la EBC ha desarrollado la unidad EBU (*European Bitterness Units*). Este parámetro es un indicador de la cantidad de iso-alfa-ácidos presentes en una cerveza. No mide el amargor percibido, que será una función de los EBU, la densidad de la cerveza, y su contenido alcohólico, y ha de determinarse por análisis sensorial mediante un panel de catadores expertos. Valores superiores a 120 EBU dejan de ser un indicador válido debido a la saturación del amargor.

El método desarrollado por la EBC consiste en añadir ácido clorhídrico e iso-octano a la muestra, agitando para a continuación decantar la fase orgánica. Los iso-alfa-ácidos tienen carácter hidrofóbico, que se acentúa con la adición de ácido, con lo que se consigue que pasen a la fase de iso-octano inmiscible con el agua. A continuación, se mide la absorbancia de esta fase orgánica frente a la del iso-octano puro, multiplicando el resultado por 50 para obtener los EBU (Popescu et al. 2013).

Es también habitual el uso de las unidades IBU (*International Bitterness Units*), que se basan en el mismo principio pero no siguen el procedimiento estandarizado por la EBC. Ambas unidades son prácticamente equivalentes.

2.1.3.3. Derivados hidrogenados de los alfa-ácidos

Industrialmente, se han desarrollado una serie de modificaciones de los iso-alfa-ácidos, obtenidas mediante hidrogenación y/o reducción con borohidruro de sodio de productos derivados del lúpulo. Las tres principales familias de compuestos obtenidos son los rho-iso-alfa-ácidos (RIAA), tetrahidro-iso-alfa-ácidos (TIAA) y hexahidro-iso-alfa-ácidos (HIAA) (Oladokun et al. 2016). En la Tabla 2 se incluye una valoración de la intensidad de su amargor respecto a los iso-alfa-ácidos, así como una descripción cualitativa de su perfil de amargor.

Tabla 2. Descripción sensorial de los ácidos amargos derivados del lúpulo (Schönberger y Kosteletzky 2011).

Compuesto	Amargor relativo	Perfil de amargor
Iso-alfa-ácidos	1	Astringente, calcáreo
Rho-iso-alfa-ácidos	0,67	Medicinal, metálico, agudo, astringente
Tetrahidro-iso-alfa-ácidos	2,03	Vegetal, afrutado, plano
Hexahidro-iso-alfa-ácidos	1,15	Medicinal, metálico, aspirina, vegetal, verde

2.1.3.4. Aroma

Es complicado desarrollar el perfil aromático del lúpulo debido a los múltiples factores implicados. En primer lugar, hay cerca de 300 aceites esenciales diferentes en el cono de lúpulo, responsables del aroma y sabor. Estas sustancias, además, presentan umbrales de percepción que varían en función del medio en el que se encuentren, y que también se ven afectadas por interacciones con otros compuestos aromáticos que pueden potenciarse entre sí o enmascarse. En la Tabla 3 se describe de forma general los principales grupos de sustancias asociadas al aroma a lúpulo.

Tabla 3. Descripción sensorial de los compuestos aromáticos del lúpulo (Schönberger y Kosteletzky 2011).

Compuestos	Aroma
Aldehídos	Verde, hierba recién cortada
Ésteres, nerol, linalool	Cítrico
Linalool, geraniol, β -ionona, citronelol, 4-MMP, 3-MH	Floral, afrutado
Sesquiterpenos oxidados	Herbal

Por otra parte, existe una gran variedad de lúpulos disponibles comercialmente, y cada año se desarrollan nuevas cepas (particularmente en Nueva Zelanda y EEUU, principales productores) con el objetivo tanto de mejorar su producción y resistencia, como de desarrollar nuevos perfiles de sabor, aroma y amargor. Estas características organolépticas se ven alteradas también por el lugar de cultivo, y la fecha de recogida.

Los aceites aromáticos se volatilizan con facilidad, por lo que la cantidad en la que se encuentren presente en la cerveza dependerá del momento en el que el lúpulo se añada a la cocción. Cuanto más tarde se incorporen, mayor cantidad permanecerán en el producto final. Con el fin de producir cervezas con un aroma más potente, se han desarrollado nuevas técnicas durante la elaboración, entre las que destacan el *late-hop* y el *dry-hop*.

El *late-hop* consiste en añadir lúpulo al final del proceso de cocción o incluso durante el *whirlpool* (agitación del mosto posterior a la cocción para precipitar los sólidos presentes). De esta manera, los aceites aromáticos no se evaporan tanto como en una adición de lúpulo tradicional, aunque el lúpulo se ve afectado en cierto grado por la temperatura al estar el mosto aún caliente.

El *dry-hop*, popularizado por las cerveceras artesanales estadounidenses, es una técnica relativamente reciente y poco estudiada a nivel científico. Se trata de una adición de lúpulo en el proceso de fermentación secundaria. Por lo tanto, se puede considerar como una extracción en frío, en una disolución de etanol. El perfil aromático obtenido varía enormemente respecto al del *late-hop* o las adiciones tradicionales, incluso utilizando el mismo lúpulo, y es mucho más susceptible a los factores antes mencionados (lugar de cultivo y fecha de recogida). Por otro lado, es común que esta técnica se utilice con adiciones particularmente grandes de lúpulo (>500 g/hL), por lo que se llega a la saturación de determinados aromas.

2.1.3.5. Oxidación del lúpulo

En presencia de una fuente de azufre, como la cisteína, las isohumulonas pueden verse afectadas por la radiación luminosa dando lugar al compuesto 3-metilbut-2-eno-1-tiol (3-MBT), responsable del olor característico acartonado de la cerveza oxidada. El mecanismo de la reacción se describe en la Figura 3, iniciándose con la fotooxidación del cromóforo beta-tricarbonilo. El 3-MBT tiene un umbral de olor muy bajo, siendo detectable a partir de 4-7 ng/L. Una de las principales maneras de evitar su aparición es el uso de vidrio marrón, que frena la radiación por debajo de 500 nm. Esto se debe a que la radiación responsable de esta reacción es la asociada al espectro luminoso azul (350-500 nm).

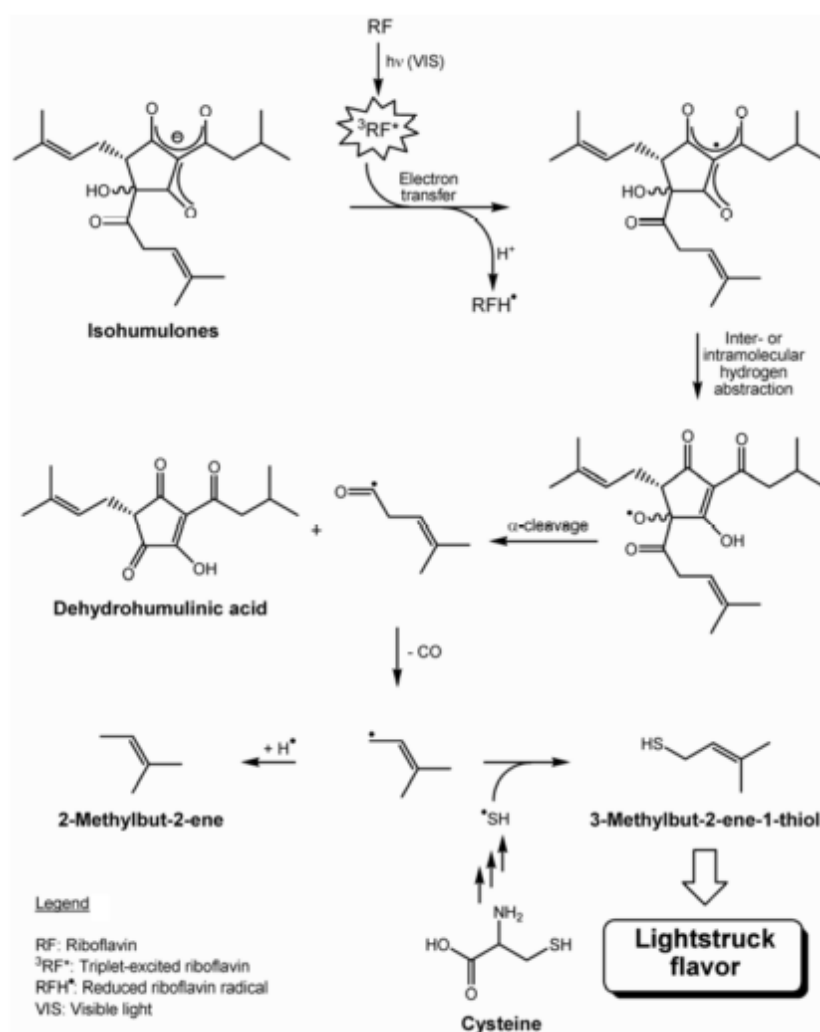


Figura 3. Mecanismo de formación de 3-MBT a partir de isohumulonas (Schönberger y Kostelecky 2011).

Al mismo tiempo, se ha estudiado el efecto de esta reacción sobre los iso-alfa-ácidos hidrogenados obtenidos como derivados del lúpulo. Se ha llegado a la conclusión de que las cervezas elaboradas con RIAA y TIAA son más estables frente a la luz, desarrollándose el proceso oxidativo de forma más

lenta. Además, los compuestos de oxidación que se forman en estos casos presentan un aroma menos desagradable que el del 3-MBT, el cual aparece en concentraciones más bajas (Schönberger y Kostecky 2011).

2.1.4. Levadura

La levadura es el elemento clave para la producción de cerveza. Durante miles de años, la humanidad ha elaborado cerveza sin tener conocimiento de la existencia de los microorganismos; sin embargo hoy en día se reconoce y estudia el papel de la levadura como parte esencial del proceso.

Este microorganismo procesa los azúcares fermentables presentes en el mosto de cerveza, mediante una fermentación anaerobia en la que se produce CO_2 y etanol. En la fermentación, se forman también una serie de productos secundarios con una gran influencia en las características organolépticas de la cerveza. Algunos de estos compuestos son deseables dentro un rango (como los ésteres, responsables de sabores afrutados) mientras que la presencia de otros se considera un defecto de la cerveza (el diacetilo, causante de un sabor a mantequilla, o los ácidos grasos de cadena corta, que afectan negativamente al sabor y a la consistencia de la espuma). En la Figura 4 se incluye un esquema simplificado de las principales rutas metabólicas que tienen lugar dentro de la levadura.

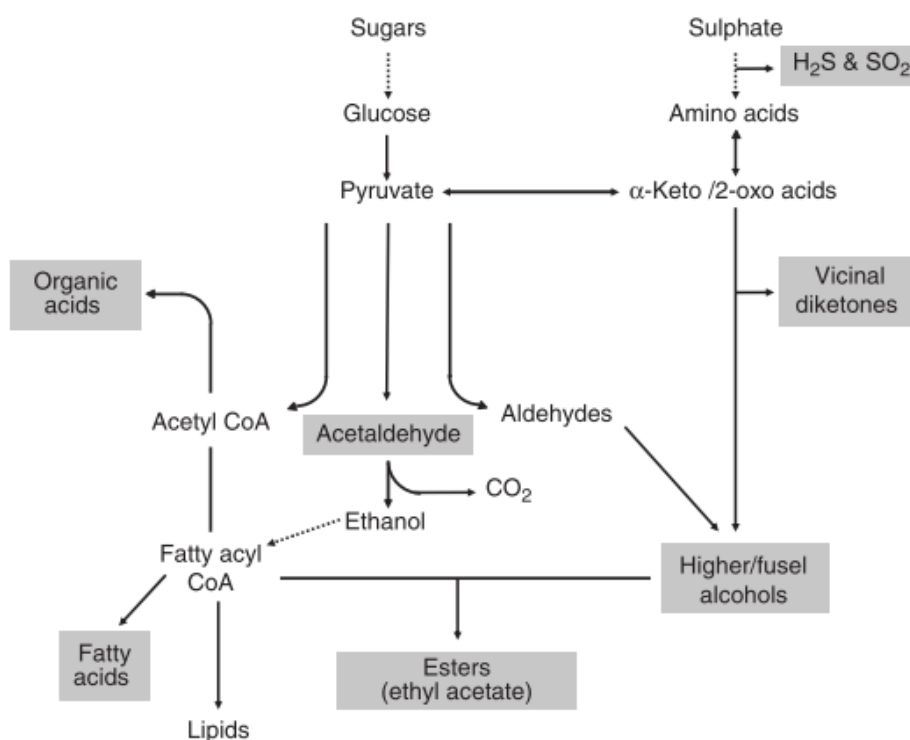


Figura 4. Rutas metabólicas principales de la fermentación anaerobia de la levadura, en relación con los compuestos asociados al sabor de la cerveza (Lodolo et al. 2008).

Existen dos tipos de levadura, que dan lugar a dos ramas de cerveza distintas: las levaduras ale (*Saccharomyces cerevisiae*), que fermentan a temperaturas más elevadas (18-24 °C) y son más diversas genéticamente, y las levaduras lager (*Saccharomyces carlsbergensis*) que requieren temperaturas más bajas (8-14 °C) y genéticamente son más uniformes (Lodolo et al. 2008).

Otra propiedad que diferencia a las dos clases de levaduras es su comportamiento durante la fermentación. Las levaduras ale flocculan y flotan hacia la parte superior del fermentador, atrapando burbujas de CO₂. Por el contrario, la levadura lager sedimenta al floccular, acumulándose en la parte inferior. De ahí que sea habitual el uso de fermentadores troncocónicos, debido a la facilidad para retirar la levadura lager flocculada del cono de la parte inferior del tanque.

Por norma general, la mayoría de cervezas artesanas son del tipo ale, ya que la fermentación es más rápida y sencilla al poder realizarse a temperatura ambiente. Por el contrario, las cervezas lager requieren de un tiempo de maduración en frío, durante el cual la levadura que permanece viva elimina ciertos subproductos que darían lugar sabores extraños. Debido a los costes adicionales de la maduración en frío, es una variedad que no suele producirse por parte de cerveceros artesanos sino que está limitada a la producción industrial.

Los factores más importantes para el correcto crecimiento y fermentación de la levadura incluyen la temperatura, la presencia de nutrientes, y el oxígeno disuelto en el medio.

2.1.4.1. Aporte de carbono

El nutriente esencial en el desarrollo de la levadura son los carbohidratos, de los cuales se utilizan la glucosa y fructosa, maltosa y maltotriosa (siguiendo este mismo orden de uso por parte de la célula). Los carbohidratos de mayor tamaño que los trisacáridos no son consumidos por la levadura. La maltosa es el principal azúcar del mosto de cebada (50-55%) seguido de la maltotriosa (10-14%). En la Figura 5 se indican las concentraciones iniciales de estos azúcares y su evolución en una fermentación de tipo lager.

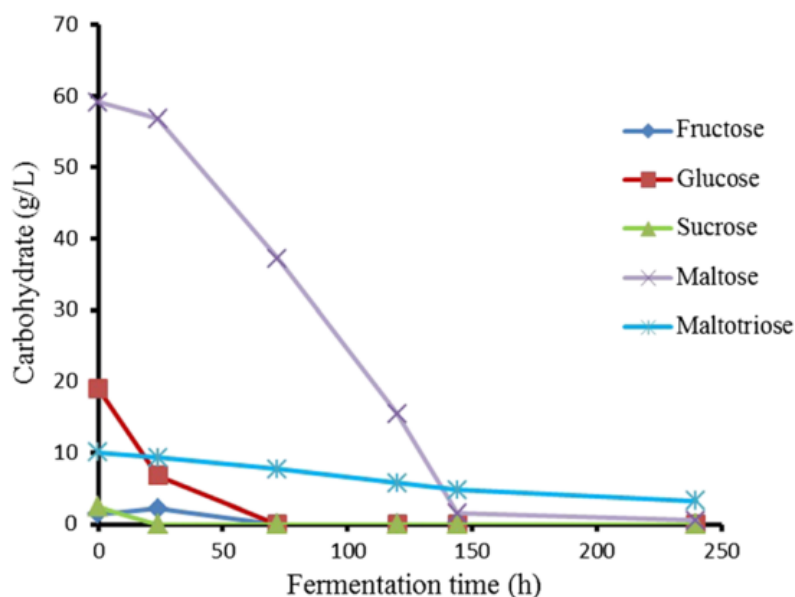


Figura 5. Cambios en la concentración de carbohidratos del mosto durante la fermentación con la cepa TT-21 de levadura lager (He et al. 2014).

La alteración de estas proporciones puede tener efectos negativos sobre la fermentación, ya que se ha demostrado que la levadura presenta mayor viabilidad en medios ricos en maltosa que en los que contienen predominantemente glucosa. Este factor debe tenerse en cuenta a la hora de utilizar siropes de glucosa y/o fructosa para aumentar el contenido en carbohidratos del mosto.

2.1.4.2. Aporte de nitrógeno

El nitrógeno que la levadura puede asimilar se conoce como FAN (*Free Amino Nitrogen*) y se corresponde con la suma del nitrógeno presente en aminoácidos, péptidos de pequeño tamaño y iones amonio presentes en el mosto. Además de ser un nutriente necesario para que la levadura pueda sobrevivir y crecer, es un factor importantísimo en el desarrollo del sabor de la cerveza.

Al incrementar el FAN del mosto, se obtienen concentraciones crecientes de alcoholes superiores, ésteres; y dicetonas vecinales como el diacetilo (He et al. 2014). La utilización del FAN por parte de la levadura dependerá también del tipo de aminoácidos disponibles. Por lo tanto, se consiguen perfiles aromáticos y de sabor totalmente distintos en el producto final en función de la cantidad y tipo del nitrógeno libre.

2.1.4.3. Oxígeno disuelto

La presencia de oxígeno disuelto en el medio de fermentación debe estar correctamente balanceada, puesto que tanto el exceso como el defecto de esta sustancia causará una fermentación deficiente.

El aporte de oxígeno es necesario para la síntesis de ácidos grasos insaturados como el palmitoleico (C16:1) o el oleico (C18:1), y de otros lípidos como el ergosterol (ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol). Todos estos compuestos tienen en común su función estructural al formar parte de la bicapa lipídica de la membrana celular. Por ello, una falta de oxígeno da lugar a células con membranas inadecuadas para soportar la presión osmótica y las elevadas concentraciones de etanol propias de la fermentación.

Por otra parte, el oxígeno disuelto ocasiona la aparición de especies reactivas de oxígeno (ROS), responsables de la oxidación celular. La levadura dispone de mecanismos, como las enzimas catalasa, superóxido dismutasa o peroxidasa, para frenar el daño causado por estas especies. Además, la presencia de polifenoles en el medio contribuye a reducir el estrés oxidativo. Sin embargo, cuando estas defensas antioxidantes son superadas por las ROS, se produce un daño celular irreversible.

2.2. Proceso de producción

2.2.1. Limpieza y pretratamiento

El proceso de elaboración comienza con la limpieza y desinfección del equipo, utilizando productos como hidróxido de sodio y ácido peracético, alternándolos con lavados con agua caliente para evitar que los restos de estas sustancias alteren el pH de la elaboración. Una vez el equipo está limpio y seco, se procede al tratamiento del agua de red para que esté en condiciones óptimas. Para ello, se filtra con carbón activo para eliminar el cloro y se añade vitamina C para eliminar el oxígeno disuelto. Además, se regula su contenido en sales con CaSO₄ y CaCl₂, así como el pH utilizando ácido fosfórico.

2.2.2. Molienda

A continuación, se realiza el molido de la malta, que debe abrir el grano lo suficiente como para que se pueda extraer su contenido pero sin desmenuzarlo, para que la cáscara actúe como filtro natural. Debe realizarse justo antes de la elaboración para evitar la oxidación de los ácidos grasos.

2.2.3. Macerado

Una vez molida, la malta se macera en agua caliente. Los parámetros del macerado (temperatura, tiempo, pH y relación agua/malta) deben controlarse para asegurar la actuación de las enzimas deseadas. Las más importantes son la α y β -amilasas, ya que son responsables de la conversión del almidón de la malta en azúcares fermentables. Sin embargo, si se descuida la acción del resto de enzimas se obtendrá un mosto que, aun siendo fermentable, no tendrá unas características de turbidez adecuadas y generará problemas en etapas posteriores del proceso.

En la Tabla 4 se incluyen las principales enzimas de la malta de cebada y los rangos en los que su actividad es óptima. Es esencial tener en cuenta que una vez se sobrepasa el límite superior del rango de temperaturas para una enzima, esta sufre un daño irreversible. Por lo tanto, el macerado debe comenzar con las temperaturas más bajas e ir subiendo progresivamente, siguiendo un proceso escalonado.

Tabla 4. Rangos de operación de las enzimas relacionadas con el macerado (Palmer 2006).

Enzima	Temperatura óptima (°C)	pH óptimo	Función
Fitasa	30 – 52	5,0 – 5,5	Disminución del pH.
Desramificadoras	35 – 45	5,0 – 5,8	Solubilización del almidón
β-Glucanasa	35 – 45	4,5 – 5,5	Reducción de turbidez y atascos
Peptidasa	45 – 55	4,6 – 5,3	Conversión de proteínas en aminoácidos
Proteasa	45 – 55	4,6 – 5,3	Reducción de turbidez
β-Amilasa	55 – 65	5,0 – 5,5	Conversión del almidón en maltosa
α-Amilasa	67 – 72	5,3 – 5,7	Conversión del almidón en diversos azúcares

La Figura 6 incluye de forma gráfica la información recogida anteriormente en la Tabla 4. El área marcada de color rojo como *Mash Target* es la región que se busca alcanzar al final del macerado, para lograr una buena conversión del almidón al permitir actuar simultáneamente a las dos enzimas amilasas.

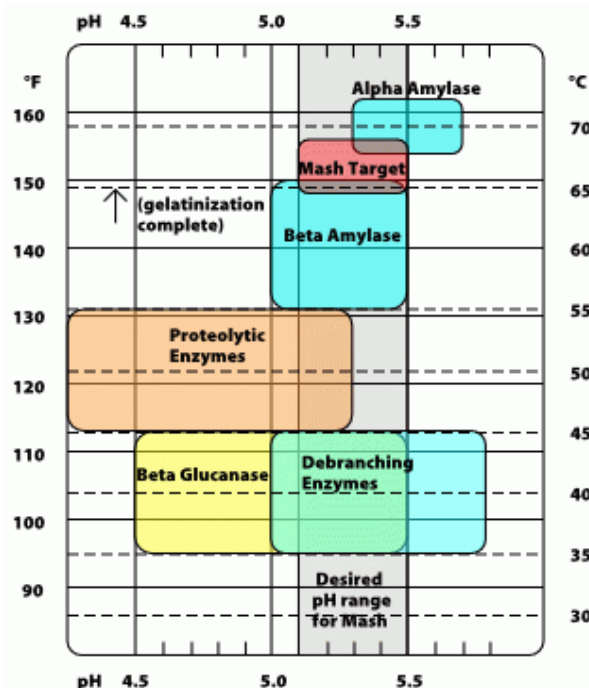


Figura 6. Regiones de actividad enzimática óptimas en el proceso de macerado (Palmer 2006).

El producto obtenido tras el macerado es un mosto rico en azúcares fermentables, obtenidos del almidón procesado por las enzimas, pero que también contiene los sólidos del grano. Por ello se utiliza la propia cáscara de la malta como filtro, recirculando el mosto a través de ella hasta se clarifique. Finalmente, se añade más agua para extraer los últimos azúcares de la malta. Este proceso se realiza a mayor temperatura, alrededor de los 78 °C, para detener la actividad de las enzimas. Sin embargo, el agua no debe estar más caliente para evitar extraer los taninos de la malta, que dan un sabor amargo desagradable.

2.2.3.1. Bagazo de malta

Tras esta etapa de macerado, se separa el grano que ha sido utilizado como filtro y al que se le han extraído sus azúcares. Este es el subproducto que ocupa el análisis de este trabajo: el bagazo de malta, también conocido por sus siglas inglesas BSG (*Brewer's Spent Grain*).

Las propiedades de este material varían entre cervcerías, ya que dependen de la combinación de cereales utilizada en la cerveza. En la

Tabla 5 se incluye información sobre el contenido en proteína, lípidos y ceniza del bagazo según distintos autores.

Tabla 5. Caracterización de muestras de bagazo de malta en porcentaje sobre materia seca.

Proteína total	Lípidos	Cenizas	Referencia
24,0	10,6	2,4	(Kanauchi, Mitsuyama y Araki 2001)
15,2	-	4,6	(Mussatto, Dragone y Roberto 2006)
21,5	11,6	3,1	(Serena y Knudsen 2007)
19-23	-	4-4,5	(Aliyu y Bala 2013)

2.2.4. Cocción

Una vez el mosto está filtrado, se procede a su cocción. En este proceso, el mosto se hierve durante una hora, aunque para cervezas de alta graduación alcohólica son habituales cocciones más largas, de una hora y media o incluso dos horas. El objetivo de la cocción es esterilizar el mosto, precipitar compuestos no deseados (proteínas y taninos) y procesar las sustancias presentes en el lúpulo, que se añade en esta etapa.

Es vital determinar en qué momento de la cocción se adiciona el lúpulo, ya que cuanto más tiempo hierva, más alfa-ácidos se isomerizarán (dando un amargor más intenso). Por el contrario, los lúpulos añadidos hacia final de la cocción tendrán sus aceites esenciales intactos, potenciando el aroma y sabor.

2.2.5. Whirlpool

Al terminar de cocer el mosto, se realiza una centrifugación o un filtrado para eliminar la mayor parte de los sólidos (restos de malta, lúpulo, proteínas precipitadas), que forman un sedimento conocido como *hot trub*.

A continuación se enfría rápidamente el líquido, para reducir el tiempo en el que el mosto caliente puede verse contaminado por microorganismos externos. Utilizando intercambiadores de calor de placas, se baja su temperatura hasta las condiciones óptimas de fermentación (por debajo de 20 °C) y se inyecta aire filtrado para oxigenar el mosto.

2.2.6. Fermentación

Finalmente, se adiciona la levadura, que crece exponencialmente hasta agotar el oxígeno disuelto. A partir de este momento, cambia su metabolismo a una fase anaerobia, realizando la fermentación alcohólica para producir CO₂ y etanol. Durante esta etapa, el proceso es exotérmico por lo que se requiere de sistemas de refrigeración para mantener la temperatura adecuada. Cuando se agotan los azúcares fermentables, la gran mayoría de las células de levadura floculan y se retiran. Para ello es útil el uso de fermentadores cilíndricos (Figura 7), ya que la forma cónica de su parte inferior facilita enormemente la retirada de la levadura floculada.

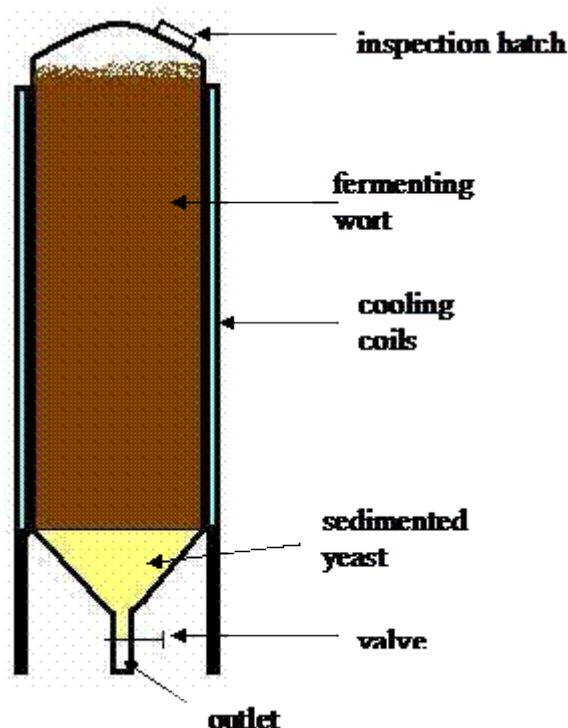


Figura 7. Esquema de un fermentador cilíndrico (Faculty of Biological Sciences, University of Leeds, 2016).

La levadura que permanece en suspensión se retira mediante bombas centrífugas, con el objetivo de recuperarla para próximos lotes, pudiendo reutilizarse hasta 5 veces sin riesgo a que su calidad se degrade significativamente. Las trazas de levadura que todavía permanecen, en la cerveza industrial se eliminan por pasteurización para evitar cambios en el producto final. En la cerveza artesanal, sin

embargo, se tiende a dejar esta levadura intacta, ya que se busca que el sabor de la cerveza evolucione con el tiempo incluso tras el embotellado.

2.2.7. Maduración

Una vez completado el proceso de fermentación y retirada la levadura, se obtiene un producto denominado cerveza “verde”, cuyo sabor, aroma y aspecto deben ser ajustados antes de distribuirse a los consumidores. Es por ello necesaria una maduración, que generalmente se lleva a cabo en dos etapas.

2.2.7.1. Maduración en caliente

En primer lugar, la cerveza se mantiene a una temperatura similar o ligeramente superior a la temperatura de fermentación. De esta manera, las células de levadura residuales que no se hayan filtrado continúan procesando el medio. El objetivo de este paso es eliminar los compuestos que generan sabores y aromas desagradables, siendo especialmente importantes el diacetilo, el dimetilsulfuro y el dióxido de azufre, debido a la facilidad con la que se detecta su aroma en las cervezas lager.

La eliminación del diacetilo por debajo del umbral de percepción es el factor limitante de la maduración en caliente. Al elevar la temperatura, se acelera la decarboxilación del α -acetolactato en diacetilo. A continuación, el diacetilo puede ser reducido a acetoina y butanodiol por parte de la levadura. Con esto se logra reducir el tiempo necesario de maduración. Otras técnicas alternativas incluyen la adición de enzimas para degradar estos compuestos indeseados.

2.2.7.2. Maduración en frío

En esta etapa, se busca mejorar la estabilidad coloidal de la cerveza para garantizar una ausencia de turbidez en el producto final y dificultar su aparición tras el envasado. Esta turbidez se debe a la formación de complejos entre proteínas y ciertos polifenoles (particularmente taninos), así como a los glucanos secretados durante fermentaciones que causan estrés a la levadura.

Manteniendo la cerveza a -2 °C, los complejos de proteína y taninos precipitan, lo que permite su retirada mediante filtración. Otros métodos incluyen el uso de polímeros como la polivinilpolipirrolidona (PVPP), que capturan los polifenoles presentes en la cerveza. De esta manera se reduce en gran medida la aparición de turbidez (Mikyška y Hrabak 2002), pero la falta de polifenoles puede facilitar por otra parte la oxidación de la cerveza a largo plazo al eliminarse buena parte de la capacidad reductora del medio.

2.3. Oxidación y antioxidantes

En la inmensa mayoría de los alimentos, así como en sus materias primas, se encuentran presentes lípidos en mayor o menor medida. Estos compuestos son susceptibles a procesos de oxidación, que deterioran la calidad del alimento al introducir aromas rancios, causar variaciones de color, eliminar nutrientes o generar sustancias nocivas.

Los antioxidantes se definen como las sustancias con capacidad para inhibir las reacciones de oxidación, a través de diversos mecanismos. Muchos alimentos y plantas contienen de forma natural antioxidantes. Una vez se descubrió su función, empezaron a añadirse a los alimentos que carecían de ellos como aditivos para preservarlos durante períodos más largos de tiempo. Sin embargo, fueron substituidos por la aparición de los antioxidantes sintéticos, más económicos y de efecto más homogéneo. Eventualmente, la preocupación por el abuso de estas sustancias sintéticas ha derivado hacia un nuevo interés por los antioxidantes naturales, los cuales se perciben como una alternativa viable y más saludable.

2.3.1. Mecanismos de oxidación

2.3.1.1. Autooxidación

La autooxidación es una de las principales rutas por las que se origina el enranciamiento lipídico. Se trata de una reacción en cadena con tres pasos o etapas distintos:

- **Iniciación:** Formación de un radical libre mediante la sustracción de un átomo de hidrógeno de un lípido por parte de una especie reactiva.
- **Propagación:** Reacción del radical libre lipídico con otros lípidos o con oxígeno, generando nuevos radicales e hidroperóxidos.
- **Terminación:** Unión entre dos radicales para dar lugar a un dímero lipídico.

La presencia de hidroperóxidos en el medio de partida ofrece una ruta de iniciación secundaria, ya que su enlace O-O se rompe con relativa facilidad dando lugar a dos radicales libres. Este mecanismo de iniciación es especialmente importante en los aceites.

La descomposición de los hidroperóxidos da lugar a los llamados productos de oxidación secundaria: alcoholes, aldehídos, cetonas e hidrocarburos volátiles que, alcanzando un cierto umbral de concentración, son responsables de los aromas a rancio presentes en los alimentos oxidados.

2.3.1.2. Fotooxidación

Otra ruta de oxidación lipídica es la fotooxidación, ocasionada por la radiación lumínica. Esta reacción requiere de una serie de sustancias fotosensibles para tener lugar, y puede desarrollarse siguiendo dos vías.

El primer mecanismo, conocido como fotooxidación tipo I, aparece cuando un compuesto fotosensible se excita debido a la luz y cede un electrón o un átomo de hidrógeno a un ácido graso. De esta manera, se genera un radical libre que se propaga siguiendo la reacción en cadena descrita en la autooxidación.

La fotooxidación tipo II, por el contrario, se da cuando la sustancia sensible a la luz se excita e interacciona con una molécula de oxígeno, cambiando su estado electrónico de triplete a singulete. Este nuevo estado del oxígeno es aproximadamente 1.500 veces más reactivo con los lípidos, con lo que da lugar a la formación de hidroperóxidos al reaccionar con ellos.

2.3.1.3. Oxidación catalizada por metales

La presencia de trazas de metales es inherente a los alimentos debido a que forman parte de los organismos vivos de los que proceden. Los metales de transición, especialmente Fe, Cu y Co, reaccionan con facilidad con los hidroperóxidos dando lugar a radicales alcoxilo. De esta manera aceleran enormemente las reacciones de oxidación. Posteriormente el ion metálico reducido se regenera al reaccionar con otro hidroperóxido.

Por otro lado, los metales pueden reaccionar con los ácidos grasos directamente, llevando a cabo la iniciación de la oxidación. Sin embargo, la presencia de hidroperóxidos en los aceites de forma natural hace que no sea necesaria la acción de los metales para iniciar el proceso.

2.3.2. Compuestos fenólicos

Bajo el nombre general de fenoles, se engloban una multitud de sustancias bioquímicas con una característica común: la presencia de, al menos, un grupo fenol. Este consta de un anillo aromático al que se une un grupo hidroxilo.

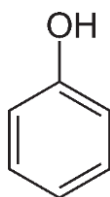


Figura 8. Representación del grupo fenol.

Muchos compuestos fenólicos son capaces de captar ROS y radicales libres, entre otras características. Estas sustancias son responsables de la iniciación y propagación de las reacciones de oxidación. Su aparición está favorecida por la presencia de trazas de metales (como hierro o cobre). En productos alimentarios, estas reacciones degradan el sabor y las características organolépticas, de ahí que se busque prevenirlas para conservarlos durante más tiempo.

Los fenoles con actividad antioxidante logran estabilizar los radicales libres, gracias a un mecanismo de deslocalización electrónica que se ve favorecido por el incremento de grupos hidroxilo unidos al anillo fenólico (Cuvelier, Richard y Berset 1992). De esta manera, el propio grupo fenólico se convierte en un radical fenoxi, mucho más estable que el radical libre y que por lo tanto detiene la cadena de propagación. Por otra parte, algunos polifenoles también presentan actividad antioxidante gracias a su capacidad de quelar los iones metálicos que inician la oxidación (Vanderhaegen et al. 2006).

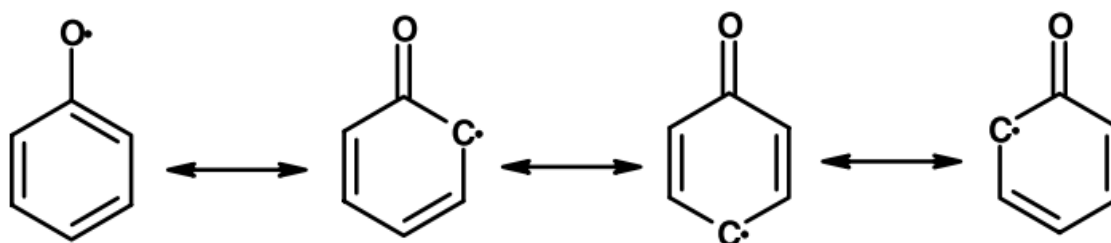


Figura 9. Mecanismo de estabilización del radical fenoxi mediante deslocalización (Vanderhaegen et al. 2006).

2.3.3. Antioxidantes en la malta de cebada

El grano de cebada contiene diferentes tipos de sustancias antioxidantes en su estado natural, como ácidos hidroxicinámicos, flavonoles, proantocianidinas y flavan-3-oles (Maillard et al. 1996; Aron y Shellhammer 2010). La distribución de estos compuestos no es uniforme. Se encuentran en distintas concentraciones en los distintos tejidos del grano. Por ejemplo, los tocoferoles se encuentran en mayor cantidad en la región más interior, el germen (Peterson 1994). Por el contrario los ácidos fenólicos, como el ferúlico o el *p*-cumárico, están más presentes en la cáscara externa.

Las reacciones de pardeamiento de Maillard tienen lugar tras someterse al proceso de tostado a altas temperaturas; dan lugar a productos con poder antioxidante. Por ello, el perfil de compuestos fenólicos de la malta es distinto del que presenta la cebada natural.

Los principales tipos de compuestos fenólicos que se pueden encontrar en la malta de cebada, son los flavan-3-oles, los ácidos hidroxicinámicos, y los flavonoles (Maillard et al. 1996). En la Tabla 6 se

presentan los contenidos en estas sustancias de distintas variedades de cebada sin maltear, mientras que en la Tabla 7 se incluyen los datos de los mismos tipos de cereal una vez tostado.

Tabla 6. Contenido en antioxidantes de distintas variedades de cebada (Maillard et al. 1996).

Variedad	Flavan-3-oles (mg/g seco)	Ácidos hidroxicinámicos (mg/g seco)	Flavonoles (mg/g seco)	Polifenoles totales (mg/g seco)	1/EQ (L dodecano /g seco)
Baraka 91	1,04±0,15	0,15±0,04	0,03±0,00	1,22	16·10 ⁻³
Volga 91	1,07±0,02	0,08±0,00	0,01±0,00	1,16	18·10 ⁻³
Triumph 91	0,95±0,00	0,08±0,00	0,01±0,00	1,04	22,5·10 ⁻³
Triumph 92	1,12±0,03	0,11±0,00	0,02±0,00	1,25	21·10 ⁻³
Triumph 93	0,89±0,06	0,08±0,00	0,01±0,00	0,98	22·10 ⁻³
Plaisant 91	1,68±0,08	0,16±0,01	0,03±0,00	1,87	37·10 ⁻³
Magie 91	1,25±0,00	0,12±0,00	0,02±0,00	1,39	22·10 ⁻³

Tabla 7. Contenido en antioxidantes de distintas variedades de malta de cebada (Maillard et al. 1996).

Variedad	Flavan-3-oles (mg/g seco)	Ácidos hidroxicinámicos (mg/g seco)	Flavonoles (mg/g seco)	Polifenoles totales (mg/g seco)	1/EQ (L dodecano /g seco)
Baraka 91	1,15±0,00	0,14±0,00	0,03±0,00	1,32	30·10 ⁻³
Triumph 92	1,84±0,16	0,20±0,01	0,03±0,00	2,07	25,5·10 ⁻³
Triumph 93	1,09±0,04	0,17±0,00	0,04±0,00	1,30	22·10 ⁻³
Plaisant 91	1,99±0,37	0,26±0,06	0,05±0,01	2,30	43·10 ⁻³
Magie 91	1,32±0,16	0,16±0,01	0,03±0,00	1,51	45·10 ⁻³

Para la obtención de estos resultados, se llevó a cabo una extracción con 2,5% de malta de cebada en metanol. La muestra se filtró y el líquido filtrado se evaporó a vacío. El extracto resultante se redisolvió en agua para determinar los polifenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu. Para determinar el contenido de flavan-3-oles, ácidos hidroxicinámicos y flavonoles se repitió el proceso redisolviendo el extracto en butan-1-ol en lugar de en agua y se analizó mediante espectrofotometría UV a 280 nm (flavan-3-oles), 320 nm (ácidos hidroxicinámicos) y a 370 nm (flavonoles) respectivamente.

2.3.4. Antioxidantes en el bagazo de malta

Tras la elaboración de cerveza a partir de la cebada malteada, se obtienen como subproductos cerca de 20 kg de bagazo de malta por cada 100 litros de cerveza producidos. Este residuo no resulta de excesivo interés para la mayoría de productores. Por norma general, se destina a la alimentación de ganado o al abono de tierras de cultivo. Debido a esta consideración del bagazo como residuo, en las cervecerías industriales se suele mezclar con el lúpulo agotado para deshacerse de ambos conjuntamente. Por lo tanto, es un subproducto con características muy heterogéneas.

No obstante, el bagazo tiene potencial para ser utilizado en muchas otras aplicaciones capaces de generar valor añadido. Entre otras, se ha valorado su utilidad como materia prima para la producción de bioetanol, medio de crecimiento para microorganismos en procesos biotecnológicos o adsorbente de metales pesados (Aliyu y Bala 2013).

La aplicación que resulta de interés para este trabajo es la obtención de compuestos fenólicos con actividad antirradicalaria partir del BSG. Durante el proceso de elaboración de cerveza, parte de estos compuestos pasan al mosto junto con los azúcares de la malta. Sin embargo una fracción se retiene en el grano, de manera que el residuo obtenido disminuye su peso respecto a la malta original y presenta una concentración mayor que ésta en compuestos fenólicos.

En la Tabla 8 se incluye un resumen de las investigaciones más recientes de distintos autores con respecto al contenido fenólico total (TPC, *Total Phenolic Content*) del bagazo de malta, además de medidas de su capacidad antioxidante a través de ensayos DPPH y ABTS.

Tabla 8. Contenido en antioxidantes del bagazo de malta según distintos autores.

Tipo de malta	Extracción	TPC	DPPH	ABTS ³	Referencia
Clara	Microondas con NaOH 0,75 %	19,5 ± 0,6 ¹	15 ± 1 %	35 ± 2	(Moreira et al. 2013)
Oscura		16,2 ± 0,6 ¹	12 ± 1 %	31,7 ± 0,7	
Pilsner (clara)	Uso directo mezclado con celulosa	6,44 ¹	5,50 ³	40,05 ± 0,4	(Kitryte, Šaduikis y Venskutonis 2015)
Seca	Homogeneización con MetOH + HCl	284,20 ± 3,07 ²	55,95 ± 0,28 %	-	(Fărcaș et al. 2015)
Liofilizada		291,47 ± 2,89 ²	53,78 ± 0,07 %	-	

1. *mg ácido gálico equivalente/g bagazo seco*
2. *mg ácido gálico equivalente/g bagazo húmedo*
3. *mg Trolox equivalente/g bagazo seco*

En el método desarrollado por Moreira et al. (2013), se realizó una extracción de BSG al 5% en una disolución de NaOH al 0,75%. Para ello se utilizó un sistema de reacción con microondas, manteniendo la muestra a 100 °C durante 15 min con agitación constante. A continuación se centrifugó a 4.000 RPM durante 15 min. El sobrenadante se ajustó a pH 6,5 y se filtró para obtener el extracto.

La extracción de polifenoles de Kitrytė, Šaduikis y Venskutonis (2015) se llevó a cabo mediante la técnica QUENCHER (Serpen et al. 2007) para poder acceder a los insolubles del bagazo. En este método, las muestras se disuelven al 1,33% en NaOH 2 M con agitación constante. Se realizan lavados sucesivos de la muestra con 50 mL de agua (5 lavados), 50 mL de etanol (3 lavados), y 50 mL de agua (3 lavados). Entre cada lavado, se realizó una centrifugación a 1500 g durante 10 min. Finalmente, el precipitado se liofilizó y se conservó en atmósfera ausente de humedad.

Fărcaș et al. (2015) utilizaron 1 g de muestra y la disolvieron en metanol puro acidificado (0,3% HCl) utilizando un homogeneizador. A continuación, se centrifugó a 4.000 RPM durante 10 min, para finalmente evaporar el extracto en un rotavapor.

En el método de McCarthy et al. (2012) de la Tabla 9, se utilizó para el primer extracto un homogeneizador para procesar malta al 5% en agua, dejándolo reposar y tomando el sobrenadante. Para el cuarto extracto de la tabla, se tomó el precipitado y se agitó durante 1 h con NaOH 110 mM

dos veces consecutivas, para después centrifugarlo y obtener el sobrenadante. El precipitado se volvió a extraer utilizando NaOH 1 M durante 16 h con agitación en la oscuridad, siendo el sobrenadante obtenido el segundo extracto. Finalmente, el tercer extracto se obtuvo mediante una extracción del precipitado anterior con agua durante una hora.

Tabla 9. Capacidad antioxidante del bagazo de malta a partir de extractos secuenciales (McCarthy et al. 2012).

Tipo de malta	Extracción	TPC	FRAP
Clara	Homogeneización con agua	$0,280 \pm 0,000^1$	$0,20 \pm 0,00^1$
	Extracción con NaOH 1 M	$8,547 \pm 0,320^1$	$4,80 \pm 0,13^1$
	Precipitado de extracción anterior con agua	$3,000 \pm 0,040^1$	$1,73 \pm 0,00^1$
	Extracción con NaOH 110 mM	$1,180 \pm 0,020^1$	$1,20 \pm 0,00^1$
Oscura	Homogeneización con agua	$1,660 \pm 0,020^1$	$1,20 \pm 0,00^1$
	Extracción con NaOH 1 M	$9,760 \pm 0,267^1$	$7,07 \pm 0,27^1$
	Precipitado de extracción anterior con agua	$3,560 \pm 0,133^1$	$2,27 \pm 0,00^1$
	Extracción con NaOH 110 mM	$2,560 \pm 0,200^1$	$2,00 \pm 0,20^1$

1. mg ácido gálico equivalente/g bagazo seco

Las extracciones llevadas a cabo por Meneses et al. (2013) incluidas en la Tabla 10 utilizan seis disolventes distintos, en distintas concentraciones (exceptuando el acetato de etilo y el hexano, utilizados únicamente puros). Para obtener los extractos, se mezcló un 5% de BSG con disolvente ajustado a la concentración requerida. A continuación, se sometieron a agitación en un baño de agua a 80 °C en caso de la extracción con agua, y de 60 °C con el resto de disolventes (debido al bajo punto de ebullición). El líquido obtenido se filtró mediante papel de filtro y membranas de 0,22 µm de diámetro de poro.

Tabla 10. Capacidad antioxidante del bagazo de malta utilizando diversos disolventes (Meneses et al. 2013).

Extracción	TPC	DPPH	FRAP
Agua	$3,59 \pm 0,46^2$	$3,33 \pm 1,79 \%$	$0,88 \pm 0,15^1$
Metanol puro	$3,90 \pm 0,06^2$	$12,69 \pm 1,72 \%$	$1,07 \pm 0,03^1$
Metanol 60 %	$4,57 \pm 0,62^2$	$10,40 \pm 1,80 \%$	$2,04 \pm 0,18^1$
Etanol puro	$4,60 \pm 0,35^2$	$5,03 \pm 0,56 \%$	$1,29 \pm 0,12^1$
Etanol 60 %	$7,13 \pm 0,24^2$	$16,91 \pm 0,78 \%$	$2,87 \pm 0,16^1$
Acetona pura	$5,66 \pm 1,00^2$	$13,45 \pm 1,62 \%$	0^1
Acetona 60 %	$9,90 \pm 0,41^2$	$18,53 \pm 0,95 \%$	$4,15 \pm 0,24^1$
Hexano puro	$4,44 \pm 0,44^2$	$2,02 \pm 0,48 \%$	$0,24 \pm 0,02^1$
Acetato de etilo puro	$2,14 \pm 0,53^2$	$5,36 \pm 0,27 \%$	0^1

1. *mg ácido gálico equivalente/g bagazo seco*
2. *mg ácido gálico equivalente/g bagazo húmedo*

3. Materiales y métodos

En esta sección, se describirán los métodos que se han seguido en la experimentación en laboratorio para obtener los resultados que se describirán posteriormente, así como el origen de las muestras utilizadas.

3.1. Muestras

3.1.1. Bagazo

Las muestras de bagazo de malta industriales fueron suministradas por Corporación Hijos de Rivera S.L. y Estrella Damm S.A. Las muestras de bagazo de lúpulo y malta artesanales fueron suministradas por Cerveza La Roqueta.

Tabla 11. Muestras de residuos de la producción de cerveza analizadas.

Muestra	Tipo de muestra	Composición conocida
Estrella Galicia	BSG industrial	Malta de cebada, maíz, restos de lúpulo
Damm 100P	BSG industrial	Malta de cebada, arroz, restos de lúpulo
Damm AB	BSG industrial	Malta de cebada, arroz, restos de lúpulo
1906	BSG industrial	Malta de cebada, maíz, restos de lúpulo
Lúpulo Artesano	Lúpulo agotado	Restos de lúpulo
Malta Artesana	BSG artesanal	Malta de cebada

Estas muestras presentan un elevado contenido en humedad (65-85%) por lo que, para evitar su degradación, se procede a eliminar la mayor cantidad de agua posible. Para ello las muestras se liofilizan a -70 °C en condiciones de vacío durante 3 días. Previamente, las muestras se someten a un prelavado con agua MilliQ tras lo cual se elimina el exceso de líquido mediante centrifugación a 3.000 rpm durante 30 min. Este prelavado tiene como objetivo eliminar cualquier traza de etanol presente que pueda dañar el sistema de vacío del liofilizador.

Una vez liofilizadas, las muestras se pesan para determinar su contenido en agua inicial. Se introducen en botes de polipropileno y se guardan en desecador hasta su uso.

3.1.2. Carne

Las muestras de carne de ternera proceden de “Embutidos La Masía”. Se han adquirido y picado en el mismo día en el que se iba a utilizar. En el laboratorio, se ha conservado la carne picada a temperaturas de congelación y protegida de la luz hasta el momento de su uso, un máximo de 30 minutos para evitar la congelación.

3.2. Métodos

3.2.1. Elaboración de extractos

Para la elaboración de extractos de bagazo, se ha empleado un método de extracción convencional similar al empleado por Meneses et al. (2013). De forma preliminar se han utilizado varios disolventes (agua MilliQ, hidróxido de sodio al 0,75%, metanol al 50%, metanol al 50% acidificado con 0,3% de ácido clorhídrico, y acetona al 50%) con el objetivo de elegir el más efectivo para la extracción de compuestos fenólicos. A continuación se ha variado tanto la concentración del mejor disolvente como la temperatura para alcanzar las condiciones óptimas a través de un análisis de superficie de respuesta.

Se han pesado el bagazo liofilizado, añadiendo a continuación el disolvente hasta una concentración del 2,5% (m/v). A continuación, se ha llevado a cabo la extracción durante 3 horas con agitación magnética. En función de la temperatura deseada, este proceso se ha realizado en nevera (extractos a 4 °C), en baño de aceite (extractos a 42 y 80 °C), o de forma directa a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo de extracción, las muestras se han centrifugado a 1.500 rpm durante 10 min y se ha recuperado el sobrenadante. Para alcanzar el mismo volumen final de extracto que volumen inicial de disolvente empleado, se mezcla el precipitado con la cantidad necesaria del disolvente, y se repite el proceso de centrifugado. Los dos sobrenadantes se mezclan y el extracto resultante se mantiene en congelación a -20 °C, en frascos de vidrio ámbar para protegerlo de la luz.

3.2.2. Diseño experimental para la optimización de extractos

Para obtener extractos con el máximo contenido en antioxidantes, expresado como TPC, se ha llevado a cabo una optimización mediante la metodología de superficie de respuesta (RSM, *Response Surface Methodology*) de las variables de extracción: temperatura y concentración del disolvente. La aplicación de la RSM permite modelar el sistema, obteniendo un polinomio de segundo orden que aproxime el TPC del extracto en función de las variables especificadas. Mediante la maximización de este polinomio, pueden obtenerse las condiciones óptimas de extracción.

3.2.2.1. Diseño compuesto centrado en las caras

Como punto de partida para modelizar el sistema, se requiere realizar un experimento factorial. En este caso se aplicará un diseño compuesto central de dos variables. Para este tipo de experimentos se parte de un diseño factorial 2^2 , donde cada variable tendrá 2 valores (niveles) posibles, codificados como +1 y -1, que servirán para establecer una región cuadrada. El punto central del cuadrado se establece mediante el nivel codificado 0 (el punto medio de los dos niveles anteriores).

Esta región se amplía con una serie de puntos axiales o de estrella, para los cuales se utilizan un valor codificado adicional α . Este último es un factor que permite aumentar o disminuir proporcionalmente la distancia a la que se encuentran los puntos axiales de la región factorial.

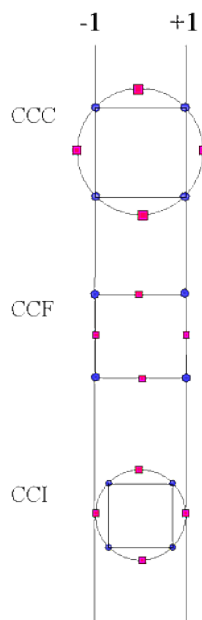


Figura 10. Variaciones del diseño compuesto central según el valor del parámetro α (NIST/SEMATECH 2012).

Cuando $\alpha > 1$, los puntos de estrella se encuentran fuera de los límites del diseño 2^2 , lo que permite obtener mayor información del sistema. Se trata de un diseño circunscrito. En el caso de que $\alpha < 1$, se obtiene un diseño inscrito, correspondiente al caso anterior pero con una escala reducida por un factor α . Es un planteamiento útil en el caso de que los valores +1 y -1 sean límites absolutos en la realidad.

Por último, cuando $\alpha = 1$, se habla de diseño centrado en las caras ya que los puntos axiales están en los vértices del diseño factorial. Su gran ventaja es que no se requieren más niveles codificados aparte de +1, -1, y 0 (NIST/SEMATECH 2012). En la Figura 10 se observan estos tres tipos de diseño compuesto central según el valor de α .

3.2.2.2. Selección de parámetros y niveles del diseño

El diseño experimental a utilizar en este estudio consta de:

- Un diseño factorial 2^2 , conteniendo cuatro puntos correspondientes a las combinaciones posibles de valores codificados +1 y -1. Estos puntos serán por lo tanto: (+1, +1), (+1, -1), (-1, +1) y (-1, -1).
- Un total de cuatro puntos axiales o de estrella, centrados respecto a las caras del diseño factorial, y a una distancia de estas caras determinada por un factor α . Las coordenadas son (α , 0), (- α , 0), (0, α), y (0, - α).
- Una serie de cinco réplicas del punto central (0, 0).

Se ha empleado un diseño con $\alpha = 1$, ya que con $\alpha > 1$ los valores codificados (- α , 0) provocarían la necesidad de trabajar a temperaturas inferiores a los 4°C de nevera, pudiendo producirse congelación de los extractos. La alternativa de utilizar un diseño inscrito con $\alpha < 1$, por otra parte, reduciría la región en la que se obtienen datos y se ha descartado. De esta forma, se trata de un diseño compuesto central centrado en las caras.

La selección de los valores reales debe respetar la equidistancia del punto central. En el caso de la temperatura, se utilizó la temperatura de la nevera como punto inferior, y los 80 °C como una temperatura adecuada para trabajar en un baño de aceite. Para la concentración, se eligió el valor medio en función de los resultados de la bibliografía para experimentos similares (Moreira et al. 2012). En la

Tabla 12 se incluyen las equivalencias entre los valores codificados y los reales.

Tabla 12. Equivalencia entre los valores reales y los codificados de las variables temperatura y concentración de NaOH para el diseño factorial.

Variable	+1	0	-1
Temperatura (°C)	80	42	4
Concentración NaOH (%)	1,45	0,75	0,05

3.2.3. Caracterización de muestras

3.2.3.1. Proteína total

El contenido total en proteína se ha determinado a partir del extracto elaborado a 80 °C y 1,45% de NaOH de cada muestra. Las muestras se han pasado por un autoanalizador Cobas.

3.2.3.2. Glucosa total

El contenido total en proteína se ha determinado a partir del extracto elaborado a 80 °C y 1,45% de NaOH de cada muestra. Las muestras se han pasado por un autoanalizador Cobas.

3.2.3.3. Cenizas

Para determinar el contenido en cenizas de las muestras, se procede a pesar las muestras de bagazo liofilizadas en cápsulas de porcelana (previamente taradas). A continuación, se introducen durante 24 horas en estufa a 500 °C. Las cápsulas se dejan enfriar en desecador y se pesan nuevamente restando la tara, obteniéndose así la masa de cenizas correspondiente a cada muestra.

3.2.4. Emulsiones

3.2.4.1. Elaboración de emulsión inicial

A la hora de analizar el efecto de los extractos naturales ricos en antioxidantes frente a la oxidación en sistemas de aceite en agua, se ha utilizado una emulsión modelo elaborada a partir de agua, aceite de girasol exento de antioxidantes y una sustancia emulsionante (Tween 20).

En primer lugar deben eliminarse los tocoferoles, antioxidantes naturales presentes en el aceite, para evitar que interfieran con los extractos. Para ello, el aceite de girasol se pasa a través de una columna rellena con alúmina (Al_2O_3) previamente secada en estufa (activada). La alúmina retiene los

tocoferoles. Para acelerar el filtrado se utiliza una bomba de vacío. El montaje se protege de la luz solar para evitar la oxidación prematura del aceite. Una vez completado, se repite con una nueva columna y la misma cantidad de alúmina. El aceite doblemente filtrado se conserva en congelación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y protegido de la luz hasta su uso.

La emulsión estará compuesta por un 89% de agua MilliQ, un 1% de Tween 20 (monolaurato de polioxietilen (20) sorbitano) y un 10% de aceite filtrado. La mezcla de agua y Tween 20 se dispone en un baño de hielo y se le aplican ultrasonidos a baja potencia, mientras se incorpora gota a gota el aceite filtrado, dejando que se deslice sobre el sonotrodo. Se mantiene la aplicación de ultrasonidos durante 5 min, pasando a potencia máxima una vez se ha terminado de añadir el aceite. La emulsión obtenida se conserva en hielo hasta su utilización.

3.2.4.2. Elaboración de emulsiones con extracto

Se dispone la emulsión inicial, a la que se le añade el extracto a estudiar hasta alcanzar una concentración del mismo del 10%. A continuación se prepara un control, siguiendo el mismo procedimiento pero utilizando un 10% del disolvente empleado en el extracto. Los viales se introducen en una estufa a $34\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación para homogeneizar el proceso oxidativo, analizándose mediante el ensayo de valor de peróxido cada 2 días (cada día en caso del control, debido a que la velocidad de oxidación será mayor).

3.2.4.3. Ensayo de valor de peróxido

El valor de peróxidos (VP) o índice de peróxidos (IP) es una medida del grado de oxidación primaria de los lípidos. Los hidroperóxidos son los principales responsables del enranciamiento de los alimentos que contienen grasas o aceites, y se forman durante las primeras etapas de oxidación.

El mecanismo químico de esta prueba se basa en el alto potencial oxidativo de los peróxidos. La muestra se diluye en etanol o metanol, y se añaden una sal de Fe^{2+} , tiocianato de amonio, y ácido clorhídrico. En medio ácido, los peróxidos oxidan el Fe^{2+} dando lugar a Fe^{3+} . Este a su vez, forma un complejo de color rojo intenso con el tiocianato (Muresan y Muste 2010).

La cantidad de este complejo se puede determinar midiendo la absorbancia a 500 nm. A partir de esta absorbancia y un calibrado siguiendo el método oficial puede calcularse el valor de peróxidos, que se expresa como $\text{mEq O}_2/\text{kg}$ muestra.

Para realizar este ensayo, se preparan dos reactivos con anterioridad, uno de ellos contiene ácido clorhídrico y cloruro de hierro (II) tetrahidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) y el segundo a base de tiocianato de amonio (NH_4SCN).

Se pesa una gota de emulsión con una precisión de mg ($0,01 \pm 0,009$ g). A continuación se añade etanol y se agita mediante un vórtex.

En una cubeta transparente, se introducen etanol y los dos reactivos hasta una concentración del 1,875% de cada uno, comprobando que aparece un color rojo. Se añade la muestra diluida y se agita. Finalmente, se mide la absorbancia a 500 nm.

3.2.5. Preparación de hamburguesas

A partir de las muestras de carne picada, se han preparado una serie de hamburguesas. Para ello se añade sal a la carne (1%) y antioxidante liofilizado (0,5%). Se mezcla homogéneamente, con cuidado de no exponer la carne a la luz directa ni a temperaturas superiores a 10 °C para evitar la oxidación prematura.

La carne preparada se divide en hamburguesas de 10 g, las cuales se almacenan en nevera en bandejas. Cada día a partir de su preparación, se extrae una hamburguesa para ser analizada mediante el método TBARS. De esta forma se monitoriza la evolución de la oxidación de la carne diariamente.

3.2.6. Ensayos de determinación de capacidad antirradicalaria

3.2.6.1. Método de Folin-Ciocalteu

El test de Folin-Ciocalteu es un método para determinar el contenido fenólico total de una muestra (TPC). Debe su nombre a sus creadores, Otto Folin y Vintilă Ciocâlțeu, los cuales desarrollaron el reactivo utilizado en la prueba a partir de fosfomolibdato y fosfotungstato.

El reactivo de Folin-Ciocalteu, de color amarillo intenso, reacciona con las sustancias reductoras presentes en la muestra para dar lugar a una coloración azul. Esta reacción se basa en la transferencia de electrones desde los compuestos reductores hacia el reactivo, dando lugar a complejos de fosfomolibdato y fosfotungstato de color azul, cuya absorbancia se puede medir a 725 nm (Ainsworth y Gillespie 2007).

Para que la reacción tenga lugar, debe incubarse en medio alcalino, lo que se consigue añadiendo carbonato sódico a las muestras y dejándolas reposar en oscuridad.

En primer lugar, se mezclan en una microplaca blanca la muestra diluída (agua MilliQ en el caso del blanco) y el reactivo de Folin-Ciocalteu. Se añade una disolución de Na_2CO_3 7,2%, y por último, agua. La placa se somete a agitación, tras lo cual se protege de la luz mientras incuba durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, se mide la absorbancia a 725 nm en un espectrofotómetro.

El valor obtenido para la absorbancia se compara con una calibración elaborada con ácido gálico. De esta manera se obtiene una medida de los compuestos reductores presentes en la muestra en forma de ácido gálico equivalente (GAE), lo cual sirve como una aproximación de la cantidad de compuestos fenólicos.

3.2.6.2. Método de ABTS

El test ABTS es una prueba de poder antioxidante que mide la capacidad de un compuesto para neutralizar radicales libres. El ensayo se basa en el uso del ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS) para la generación de un catión radical libre relativamente estable, el $\text{ABTS}^{\cdot+}$. Esto se consigue haciendo reaccionar el ABTS con un agente oxidante como el persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$).

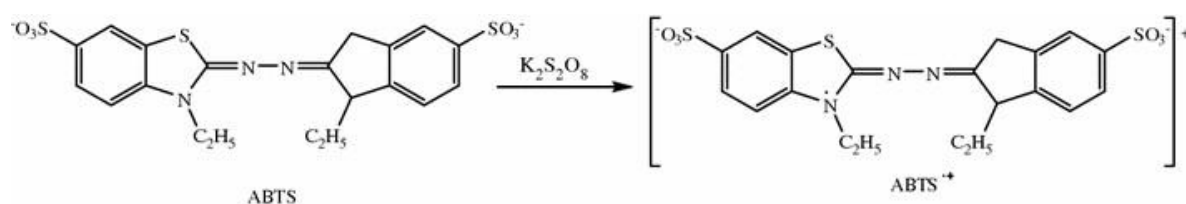


Figura 11. Generación del radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ mediante la oxidación con $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (Gülçin 2012).

El $\text{ABTS}^{\cdot+}$ es un radical con un intenso color verde-azulado, con absorción máxima a 734 nm. Al reaccionar con los compuestos antioxidantes, estos devuelven el catión a su forma original de ABTS, perdiendo su coloración. El mecanismo de reacción por el que se produce esta reducción del ABTS es la transferencia de electrones desde los antioxidantes al radical. De esta manera, la absorbancia final una vez finalizada la reacción será proporcional a la capacidad antirradicalaria.

Una de las ventajas de este método es la solubilidad del ABTS tanto en medios acuosos como orgánicos (Gülçin 2012). Esto permite, eligiendo el disolvente adecuado, tratar tanto muestras hidrosolubles como liposolubles. Por el contrario, una de sus desventajas es que el tiempo en el que se termina la reacción depende del antioxidante.

Para obtener el radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$, se incubaba una disolución de ABTS con peroxodisulfato de potasio, en condiciones de oscuridad durante 16 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se diluye en PBS (*Phosphate Buffered Saline*) y se toman medidas en el espectrofotómetro a 734 nm hasta ajustar la absorbancia a 0,7. A continuación, se distribuye la disolución en una microplaca y se añade la muestra. Se mide la absorbancia durante 30 min, a intervalos de 5 min. Se toma el valor a los 7 min, si se ha estabilizado y es constante.

Los resultados se comparan con un recta de calibrado de Trolox, preparada en la misma microplaca.

3.2.6.3. Método de ORAC

El método ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) permite estudiar la capacidad de un antioxidante para proteger una sustancia fluorescente en un medio oxidante. Se trata de una prueba *in vitro* cuyos resultados no son extrapolables directamente al medio biológico, pero se aproximan bastante.

Para generar el medio oxidante, se utiliza un compuesto azo, como el AAPH (2,2'-azo-bis (2-amidino-propano) dihidrocloruro). Al aplicar calor, este compuesto se subdivide en dos radicales, que en presencia de oxígeno dan lugar a radicales peroxilo.

Los radicales peroxilo, a su vez, reaccionan con el compuesto fluorescente (fluoresceína) presente en el medio, oxidándolo y eliminando su capacidad de emitir fluorescencia. Los antioxidantes, sin embargo, pueden interceptar tanto los radicales peroxilo como los que se forman a partir de las sustancias fluorescentes. Mediante una reacción de transferencia de hidrógeno desde el antioxidante hacia el radical, se neutraliza su actividad (Huang, Boxin y Prior 2005).

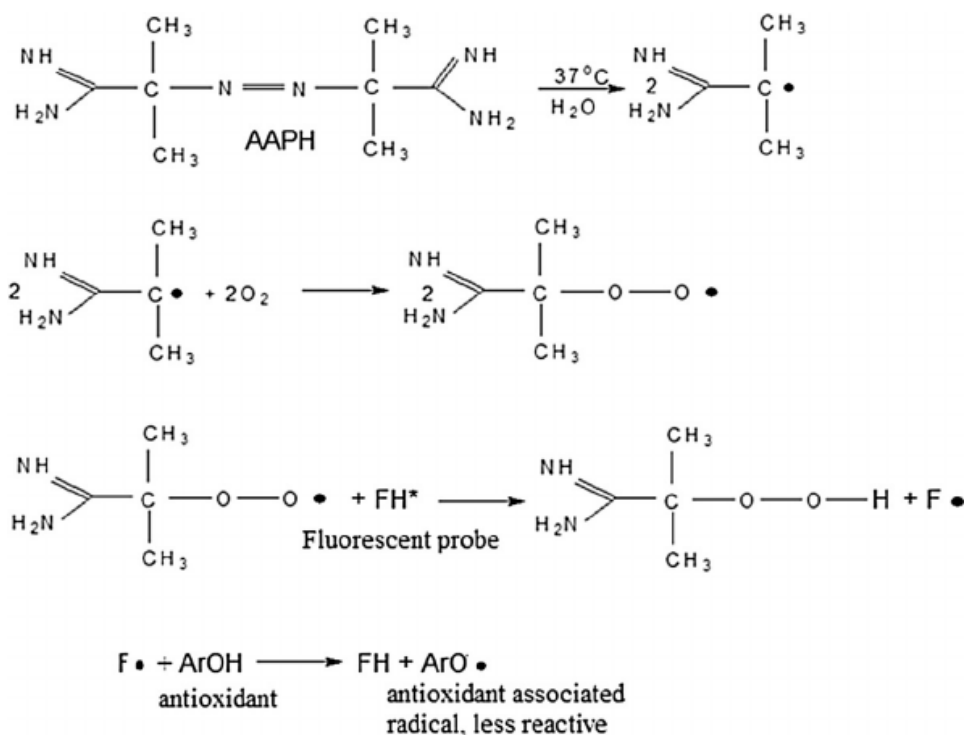


Figura 12. Mecanismo de reacción del método ORAC (Litescu et al. 2014).

En cuanto a la sustancia fluorescente, la utilizada en este caso es la fluoresceína, cuyo pico de emisión es de 521 nm y el de excitación de 485 nm. A la hora de realizar un test ORAC, se compara la pérdida de fluorescencia a lo largo del tiempo añadiendo una muestra al medio, frente a la pérdida

producida sin añadir esta sustancia (blanco). Mediante integración, se calcula el área bajo la curva, parámetro que se compara con una calibración obtenida para antioxidantes comerciales (como el Trolox).

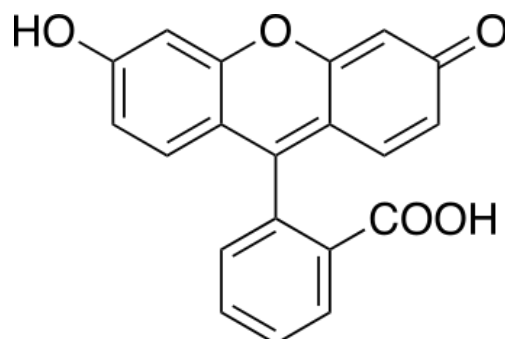


Figura 13. Representación de la molécula de fluoresceína.

En primer lugar, se ha de incubar a 37 °C el fluorímetro que se utilizará para las medidas. A continuación, se preparan una serie de diluciones de Trolox en PBS (40, 80, 120, 160 y 200 µM) para elaborar una recta patrón. Esta ha de elaborarse de nuevo en cada experimento.

20 minutos antes de llevar a cabo la medición, se diluye fluoresceína en PBS hasta una concentración del 0,25%. Esta disolución de fluoresceína se protege de la luz y se incuba en nevera. Justo antes de realizar la medida, se disuelve AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropano) diclorhidrato) al 8,14% en PBS que previamente había sido incubado a 37 °C.

Se introducen la muestra y la disolución de fluoresceína en los pocillos de una microplaca de color negro. La mezcla se introduce en el espectrofluorímetro, y tras tomar una medida inicial se extrae la placa. Se añade la disolución de AAPH, y se vuelve a introducir la placa, midiéndose la fluorescencia a lo largo de 3 horas.

3.2.6.4. Método de TBARS (carne)

El ensayo TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) permite medir el grado de peroxidación lipídica de la muestra. A diferencia de la prueba del valor de peróxidos descrita anteriormente, no se analiza directamente la cantidad de peróxidos sino que se hace a través de la cantidad de uno de los subproductos de su formación: el malondialdehído (MDA).

El MDA es un indicador del estrés oxidativo en células y tejidos. Al comparar los resultados de las muestras que incorporan antioxidantes naturales frente a aquellas que no, se puede determinar el grado en el que estos antioxidantes frenan el proceso de formación de peróxidos.

La prueba se basa en la reacción entre el MDA y el ácido tiobarbitúrico (TBA) para dar lugar a un aducto, cuya concentración puede determinarse colorimétricamente a 530-540 nm. La reacción tiene lugar a temperaturas de 90-100 °C y en medio ácido, para lo cual se añade ácido tricloroacético al medio y se introduce en un baño de agua hirviendo.

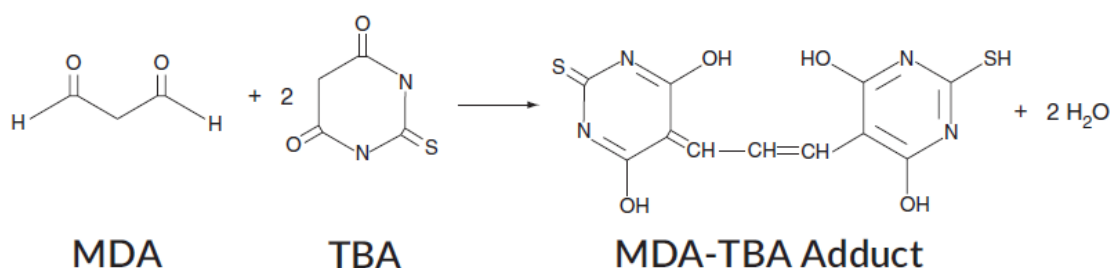


Figura 14. Mecanismo de reacción del método TBARS (Products y News 2014).

Se prepara el reactivo TBARS disolviendo ácido tricloroacético (TCA) en agua MilliQ. Al mismo tiempo, se disuelve ácido tiobarbitúrico (TBA) en agua MilliQ, utilizando calentamiento y agitación magnética. Las dos disoluciones se mezclan, añadiendo ácido clorhídrico (HCl) y enrasando con agua MilliQ hasta obtener una disolución con una concentración del 15% de TCA, 2,08% de TBA y 0,375% de HCl.

Se pesa una porción de muestra de hamburguesa de carne en un tubo de ensayo de vidrio, y se añade de disolución de EDTA y reactivo de TBARS. A continuación se homogeneiza en un Ultra Turrax colocando la muestra en baño de hielo. Una vez homogeneizado, se filtra y se introduce en un baño de agua a 100 °C durante 10 min para que tenga lugar la reacción. Finalmente se dejan reposar hasta alcanzar la temperatura ambiente, y se mide su absorbancia a 531 nm en una microplaca, utilizando agua MilliQ como blanco.

3.2.7. Análisis mediante HPLC-DAD

Para el análisis cromatográfico se parte del método desarrollado por Moreira et al. (2012) para la detección del ácido ferúlico y otros ácidos fenólicos en muestras de bagazo de malta. El análisis se ha llevado a cabo en un equipo de HPLC Waters Alliance 2690, equipado con un detector DAD Waters 996 (midiendo la absorbancia entre 190 y 400 nm). La columna utilizada es una Synergi Hydro-RP C18, de 150 x 4,6 mm y 4 µm.

Este método requiere del uso de una fase móvil compuesta por una fase acuosa y otra orgánica: ácido fórmico al 0,1% en agua (fase A) y metanol (fase B). En el laboratorio se substituyó el ácido fórmico por acético. Las muestras (extractos de bagazo) deben filtrarse previamente a través de un filtro de 0,22 µm. En cada inyección se introducen en el sistema 20 µL de muestra. En la Tabla 13 se describen las condiciones del gradiente empleado.

Tabla 13. Método de análisis cromatográfico de ácidos fenólicos para el bagazo de malta (Moreira et al. 2012).

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	A (%)	B (%)
0	0,3	90	10
110	0,3	0	100
130	0,3	0	100
140	0,3	90	10
150	0,3	90	10

Posteriormente, el método original se modificó con el objetivo de lograr una mejor separación a la hora de identificar los distintos componentes, así como de acortar el tiempo necesario para analizar las muestras.

3.2.8. Elaboración de films

3.2.8.1. Film de gelatina

Se calienta un baño de agua a 55 °C, introduciéndose a continuación un vaso de precipitados conteniendo agua y un 2,03% de gelatina neutra alimentaria. Se agita hasta completa disolución. A continuación, se retira la mezcla del baño y se añade un 0,34% de glicerol y 15,25% de extracto antioxidante. Se mezcla bien y se vierte sobre una bandeja cubierta con polietileno. Se deja secar en estufa a 32 °C.

3.2.8.2. Film de PLA

Se calienta un baño de agua a 40 °C, con un matraz Erlenmeyer conteniendo cloroformo. Se añade un 3% de PLA (ácido poliláctico) y 1% de extracto antioxidante. En el caso de que el extracto no sea miscible con cloroformo (debido al uso de un disolvente acuoso), se añade directamente 1% del producto liofilizado a partir del cual se elabora el extracto (tamizado para lograr un film lo más homogéneo posible). Se agita hasta disolución, y a continuación se vierte sobre una plancha de cristal.

3.2.8.3. Ensayos de difusividad

Para que la adición de antioxidantes a un sólido tenga utilidad, estas sustancias han de poder alcanzar el alimento. Los ensayos de difusividad permiten medir el grado en el que los antioxidantes añadidos a un film funcional se liberan en un medio en reposo, y se transportan mediante el mecanismo de difusión. Esta propiedad se mide mediante el coeficiente de difusividad D (m^2/s).

A la hora de realizar estos experimentos, se utilizan simulantes alimentarios: medios diseñados para simular las propiedades físicoquímicas de los alimentos. De acuerdo con la legislación de la Unión Europea (British Standard 2002), los plásticos en contacto con productos alimentarios deben someterse a tests de difusividad en los simulantes descritos en la Tabla 14.

Tabla 14. Grupos de simulantes alimentarios según la legislación europea (López De Dicastillo et al. 2011; British Standard 2002)

Nombre	Tipo de medio que simula	Simulante(s)
Simulante A	Acuoso	Agua destilada
Simulante B	Acuoso / Ácido	Ácido acético al 3% en agua
Simulante C	Acuoso / Alcohólico	Etanol al 10% en agua
Simulante D	Graso	Aceite de oliva refinado Aceite de girasol Aceite de maíz Mezclas sintéticas de triglicéridos Etanol al 95% en agua Óxido de polifenileno modificado Isooctano

Mediante el análisis de la concentración de antioxidantes en el simulante a lo largo de un período de tiempo, puede obtenerse el valor del coeficiente de difusividad a través de la segunda ley de Fick.

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (\text{Eq. 3.1})$$

Se recubre la pared interna de un recipiente cilíndrico de plástico con una tira de film de 10 x 1,7 cm. A continuación se llena el recipiente con uno de los simulantes alimentarios correspondientes:

- a) Simulante A: agua MilliQ
- b) Simulante B: ácido acético al 3% en agua.
- c) Simulante C: etanol al 10% en agua.
- d) Simulante D: etanol al 95% en agua.

Los recipientes se mantienen en completo reposo durante toda la duración del experimento. Se toman muestras del centro del recipiente en intervalos de 1 hora, a lo largo de 24 horas. Estas muestras se almacenan en congelación y se analizan una vez finalizado el experimento siguiendo el método ORAC.

3.2.9. Análisis estadístico

Todos los ensayos se han llevado a cabo por triplicado. Para el análisis de datos se ha utilizado el software Microsoft Office Excel, y para el estudio estadístico de los resultados se ha empleado el software Minitab 17.

4. Resultados y discusión

4.1. Caracterización de muestras

4.1.1. Proteína total

Se ha procedido al análisis de los extractos optimizados, cuyos niveles de proteínas se encuentran en la Tabla 15. La muestra con mayor cantidad de proteína es la Damm 100P: sin embargo el resultado no es significativo respecto a la muestra Damm AB. La muestra más pobre en proteínas es la de Lúpulo Artesano.

En general todas las muestras de bagazo industrial presentan valores similares de proteína, frente al lúpulo agotado que tiene el contenido más bajo. Estos resultados se muestran gráficamente en la Figura 15.

Tabla 15. Comparación del contenido total en proteína de distintas muestras de bagazo. Los resultados que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Muestra	Tipo de muestra	Proteína total (mg/g muestra húmeda)
Estrella Galicia	BSG industrial	20,831 ^b ± 0,750
Damm 100P	BSG industrial	24,562 ^a ± 1,132
Damm AB	BSG industrial	22,832 ^{a,b} ± 0,282
1906	BSG industrial	21,976 ^b ± 0,997
Lúpulo Artesano	Lúpulo agotado	8,510 ^d ± 0,109
Malta Artesana	BSG artesanal	16,506 ^c ± 0,708

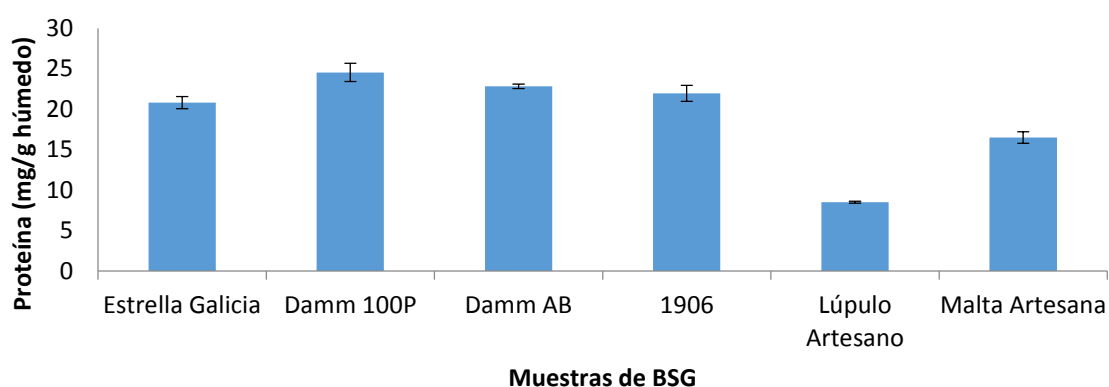


Figura 15. Comparación del contenido total en proteína de distintas muestras de bagazo. Los resultados que no comparten una letra son significativamente diferentes.

4.1.2. Glucosa total

Las seis muestras analizadas presentaban cantidades despreciables de glucosa, no siendo detectada por los instrumentos utilizados.

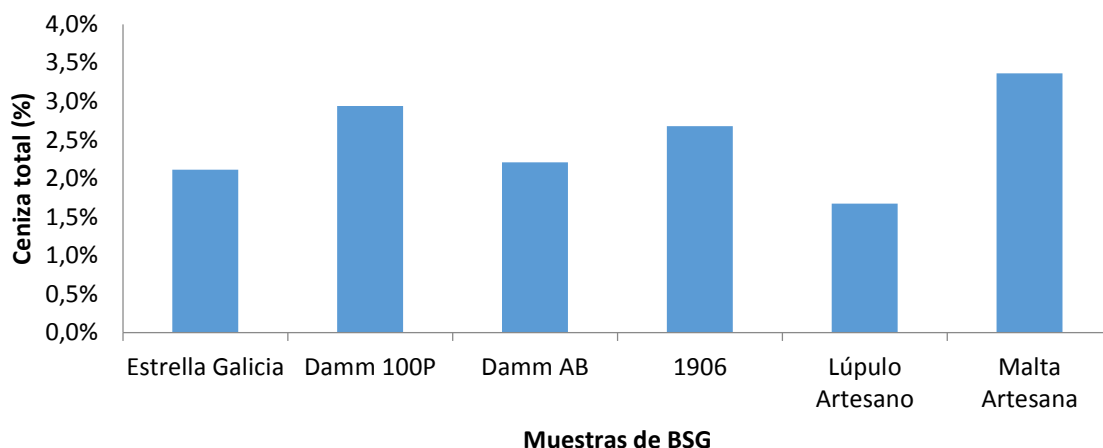
4.1.3. Cenizas

Se ha determinado el porcentaje de cenizas de las muestras respecto a su peso seco (líoofilizado). El resultado se describe en la Tabla 16. En este caso, la Malta Artesana es el bagazo con mayor porcentaje de cenizas, mientras que el Lúpulo Artesano tiene el menor. Las muestras de bagazo industrial presentan valores intermedios.

Tabla 16. Comparación del contenido total en ceniza de distintas muestras de bagazo.

Muestra	Tipo de muestra	Cenizas totales (%)
Estrella Galicia	BSG industrial	2,11%
Damm 100P	BSG industrial	2,94%
Damm AB	BSG industrial	2,21%
1906	BSG industrial	2,68%
Lúpulo Artesano	Lúpulo agotado	1,67%
Malta Artesana	BSG artesanal	3,37%

Figura 16. Comparación del contenido total en ceniza de distintas muestras de bagazo.



4.2. Determinación del disolvente óptimo

El paso preliminar a la hora de estudiar las condiciones de extracción es seleccionar el disolvente que ofrece los mejores resultados. Para ello, se utilizó como criterio el TPC de 5 extractos de la malta Damm AB obtenidos tras una extracción a 4°C en nevera durante 3 horas. El contenido fenólico fue evaluado mediante el método de Folin-Ciocalteu. Los resultados se recogen en la Tabla 17 y en la Figura 17.

Tabla 17. Comparación del efecto del disolvente sobre el TPC en extractos de bagazo de malta. Los resultados que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Disolvente	TPC (μ moles GAE/g muestra húmeda)
Agua	0,383 ^d \pm 0,089
NaOH 0,75%	13,244 ^a \pm 1,359
MeOH 50%	1,855 ^{b,c} \pm 0,134
MeOH 50% + 0,3% HCl	1,450 ^{c,d} \pm 0,100
Acetona 50%	3,171 ^b \pm 0,094

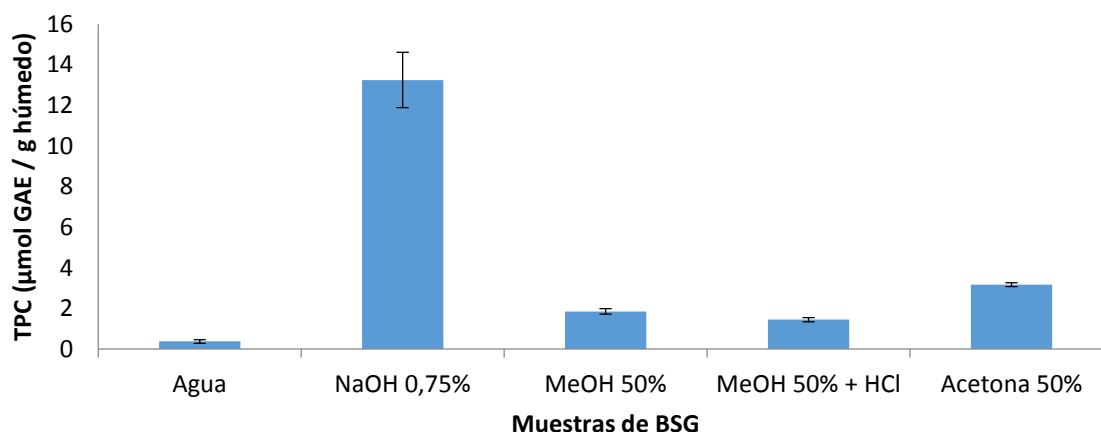


Figura 17. Comparación del efecto del disolvente sobre el TPC en extractos de bagazo de malta.

A partir de estos resultados, se puede determinar mediante un análisis ANOVA unidireccional que existe una diferencia significativa entre la extracción con diferentes disolventes. El disolvente óptimo es el agua con hidróxido sódico, siendo el TPC observado muy superior a cualquiera de los otros extractos, y más de cuatro veces mayor que en el segundo mejor caso, la acetona.

Esto permite proceder en los siguientes apartados optimizando los parámetros de concentración de NaOH y temperatura de extracción.

4.3. Determinación de las condiciones óptimas de extracción

Siguiendo el diseño experimental desarrollado anteriormente en el apartado 3.2.2, se prepararon 13 extractos, por triplicado, para preparar una superficie de respuesta. Estos extractos se analizaron siguiendo los métodos Folin-Ciocalteu, ORAC y ABTS. A continuación se detallarán los resultados obtenidos para cada uno de los tres procedimientos, analizados mediante MiniTab para aplicar la metodología RSM.

4.3.1. RSM Folin-Ciocalteu

Mediante el método de Folin-Ciocalteu, se analizaron los diferentes extractos de bagazo de malta, obteniéndose los resultados descritos en la Tabla 18 expresados como equivalentes de ácido gálico por gramo de bagazo húmedo.

Se comprueba que el extracto preparado en condiciones de mayor concentración de hidróxido sódico y mayor temperatura es el que contiene más cantidad de polifenoles totales ($30,049 \pm 1,309$ μ moles GAE/g muestra húmeda). Este resultado es ligeramente superior al de $25,8 \pm 0,8$ μ moles GAE/g muestra húmeda que se encuentra en la bibliografía consultada (Moreira et al. 2013). Una posible explicación sería que la extracción de la bibliografía se lleva a cabo con 0,75% de hidróxido sódico en lugar de 1,45%. Si se compara con el TPC del extracto elaborado con esa concentración y 80 °C, el resultado es más similar ($27,174 \pm 0,407$ μ moles GAE/ húmedo).

Tabla 18. Comparación del efecto de la temperatura y la concentración de NaOH sobre el TPC en extractos de bagazo de malta. Los resultados que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Temperatura (°C)	Concentración NaOH (%)	TPC (μ moles GAE / g muestra húmeda)
80	0,05	$6,237^e \pm 1,100$
	0,75	$27,174^a \pm 0,407$
	1,45	$30,049^a \pm 1,309$
42	0,05	$6,319^e \pm 0,462$
	0,75	$20,989^c \pm 1,314$
	1,45	$23,357^b \pm 1,085$
4	0,05	$3,981^e \pm 0,291$
	0,75	$11,285^d \pm 0,838$
	1,45	$11,661^d \pm 0,353$

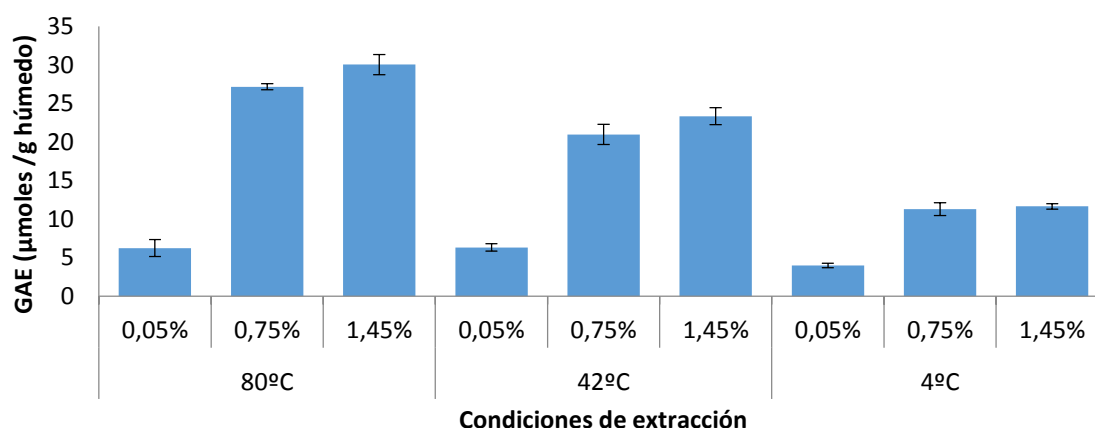


Figura 18. Comparación del efecto de la temperatura y la concentración de NaOH sobre el TPC en extractos de bagazo de malta. Los resultados que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Mediante el análisis de superficie de respuesta, a partir de estos datos se ajusta el sistema a un polinomio de segundo orden. Cabe destacar que esta ecuación utiliza todos los términos posibles tanto de primer como de segundo orden. Aplicando el polinomio para calcular el TPC en el punto central, se obtiene una predicción de 21,002 μmoles GAE/g muestra húmeda, que se ajusta de manera satisfactoria al valor medido ($20,989 \pm 1,314$).

$$TPC = 21,002 + 6,089T + 8,088[NaOH] - 1,806T^2 - 6,197[NaOH]^2 + 4,033T[NaOH] \quad (\text{Eq. 4.1})$$

La Figura 19 y la Figura 20 son una representación gráfica de esta ecuación en unidades codificadas, en 2D (gráfica de contorno) y 3D (superficie de respuesta) respectivamente. Se observa claramente que el TPC es mayor al aumentar tanto la temperatura como la concentración, lo que coincide con el extracto de mayor TPC.

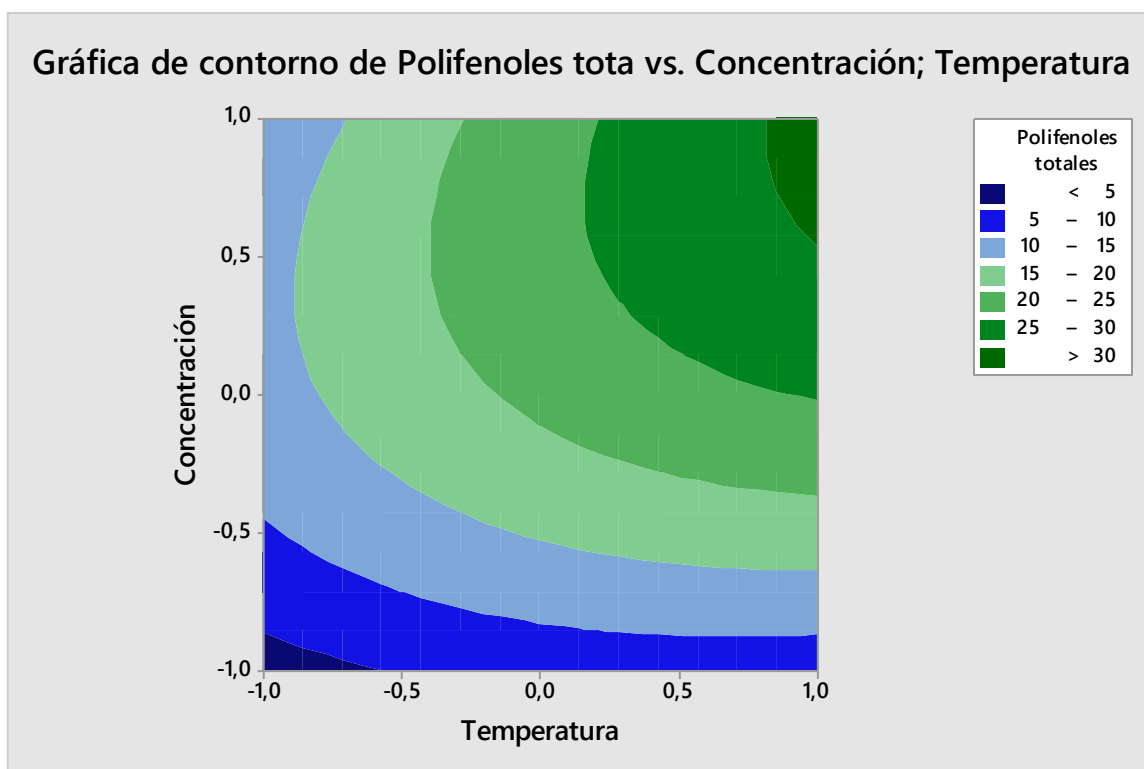


Figura 19. Gráfica de contorno del TPC en unidades codificadas.

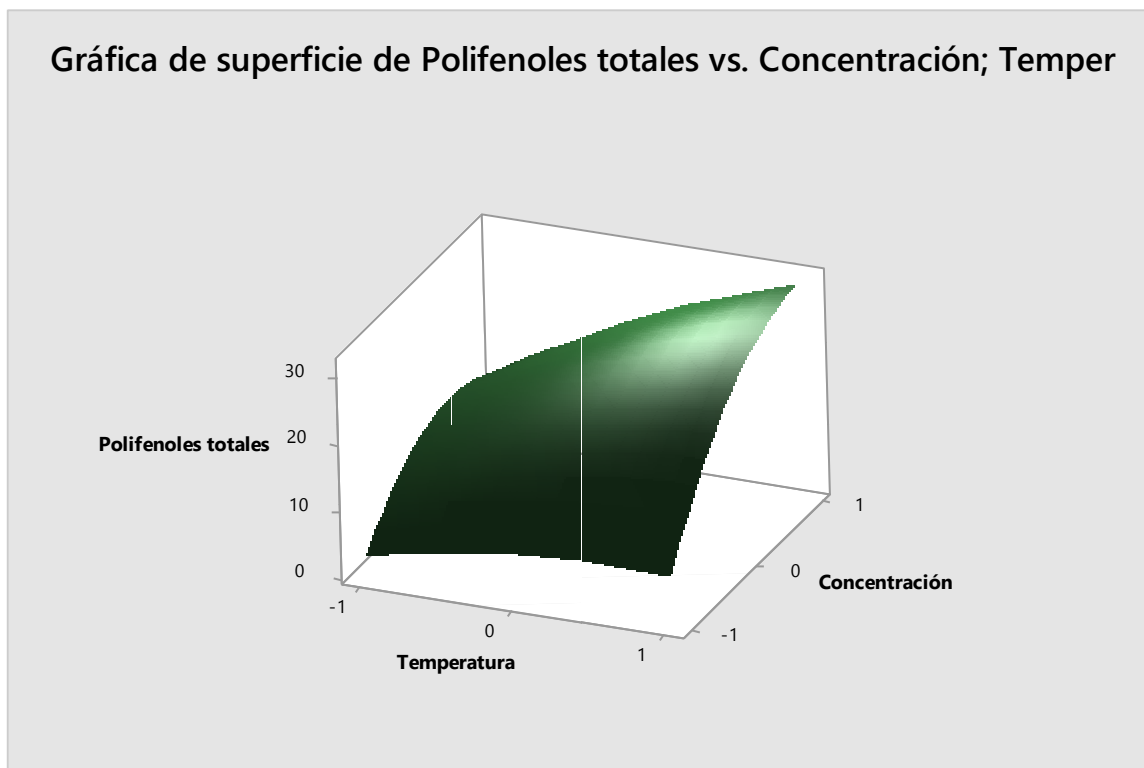


Figura 20. Superficie de respuesta para el TPC en unidades codificadas.

4.3.2. RSM ABTS

En la Tabla 19 se muestran los resultados de capacidad antioxidante obtenidos mediante el método ABTS para las distintas condiciones de extracción. Según estos resultados, el extracto obtenido con la temperatura más elevada (80 °C) y la disolución de NaOH más concentrada (1,45%) es el que ofrece una mayor capacidad antioxidante, de $85,495 \pm 2,960$ $\mu\text{mol TE/g}$ muestra húmeda. Este resultado es superior al de la bibliografía consultada, que es de $35,987 \pm 0,359$ $\mu\text{mol TE/g}$ muestra húmeda (Kitryte, Šaduikis y Venskutonis 2015). La explicación podría encontrarse en la diferente preparación del extracto. En el caso del resultado citado, el bagazo seco se introduce en una matriz sólida de microcelulosa cristalina en lugar de realizar una extracción con disolvente.

Tabla 19. Comparación del efecto de la temperatura y la concentración de NaOH sobre la capacidad antioxidante (método ABTS). Los resultados que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Temperatura (°C)	Concentración NaOH (%)	Capacidad antioxidante ABTS ($\mu\text{mol TE/g}$ muestra húmeda)
80	0,05	$7,437^e \pm 0,702$
	0,75	$51,798^b \pm 3,318$
	1,45	$85,495^a \pm 2,960$
42	0,05	$11,964^e \pm 0,837$
	0,75	$43,788^c \pm 3,190$
	1,45	$33,825^d \pm 1,347$
4	0,05	$4,867^e \pm 0,112$
	0,75	$24,908^d \pm 0,529$
	1,45	$31,495^d \pm 2,179$

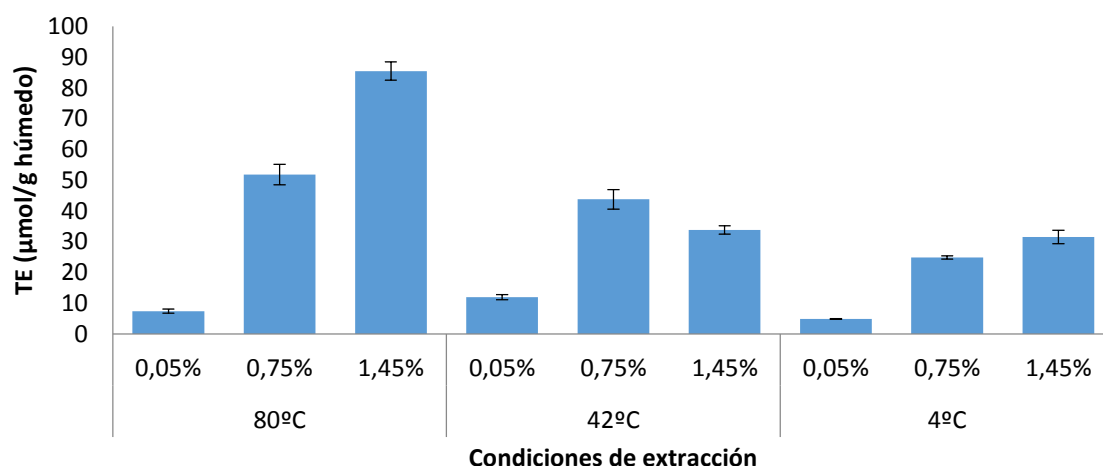


Figura 21. Comparación del efecto de la temperatura y la concentración de NaOH sobre la capacidad antioxidante (método ABTS). Los resultados que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Estos resultados se han analizado con MiniTab para aplicar la superficie de respuesta. El sistema se ajusta a un polinomio de segundo orden. En este caso, el término cuadrático de temperatura no es significativo en el modelo. Comparando el valor medido en el punto central (43,788 μmol TE/g muestra húmeda) frente al que predice el polinomio (42,24), los resultados son muy similares, lo que permite afirmar que se trata de un buen ajuste.

$$ABTS = 42,24 + 13,19T + 21,31[NaOH] - 12,83[NaOH]^2 + 11,78T[NaOH] \quad (\text{Eq. 4.2})$$

Este polinomio se representa gráficamente en el contorno de la Figura 22, mientras que en la Figura 23 se encuentra la superficie de respuesta en tres dimensiones. Al igual que en el caso del Folin-Ciocalteu con el TPC, el poder antirradicalario del extracto crece al aumentar ambos parámetros.

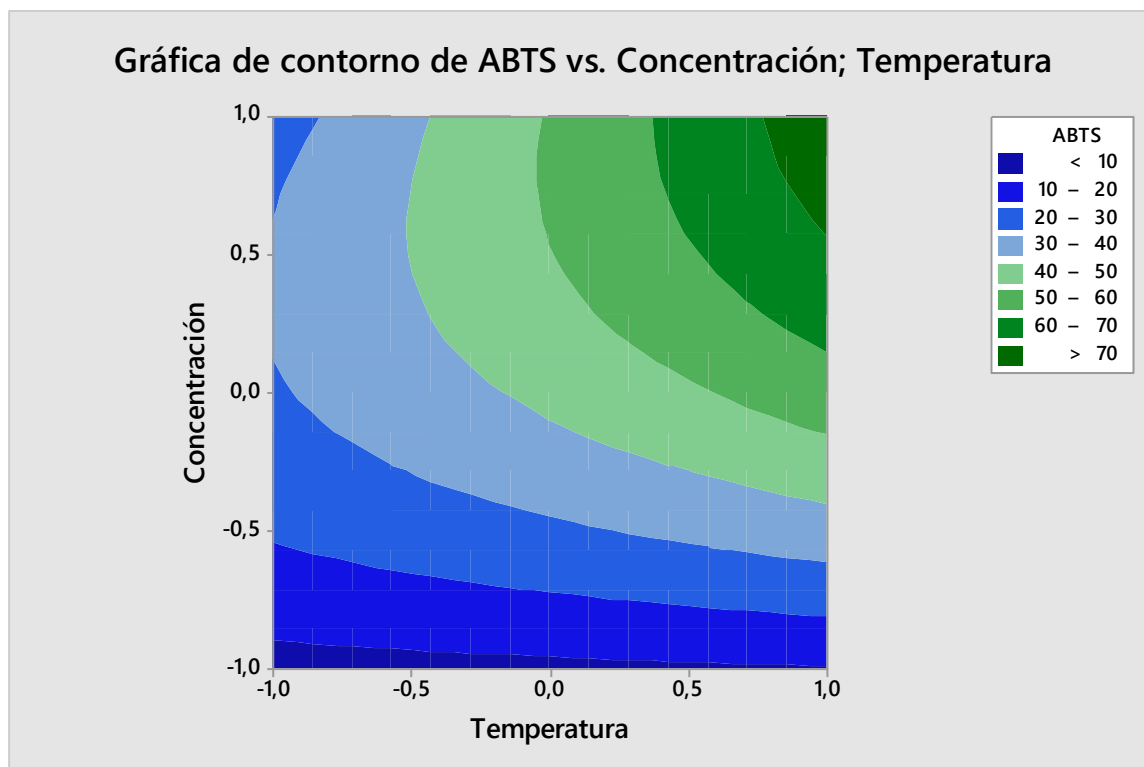


Figura 22. Gráfica de contorno del método ABTS en unidades codificadas.

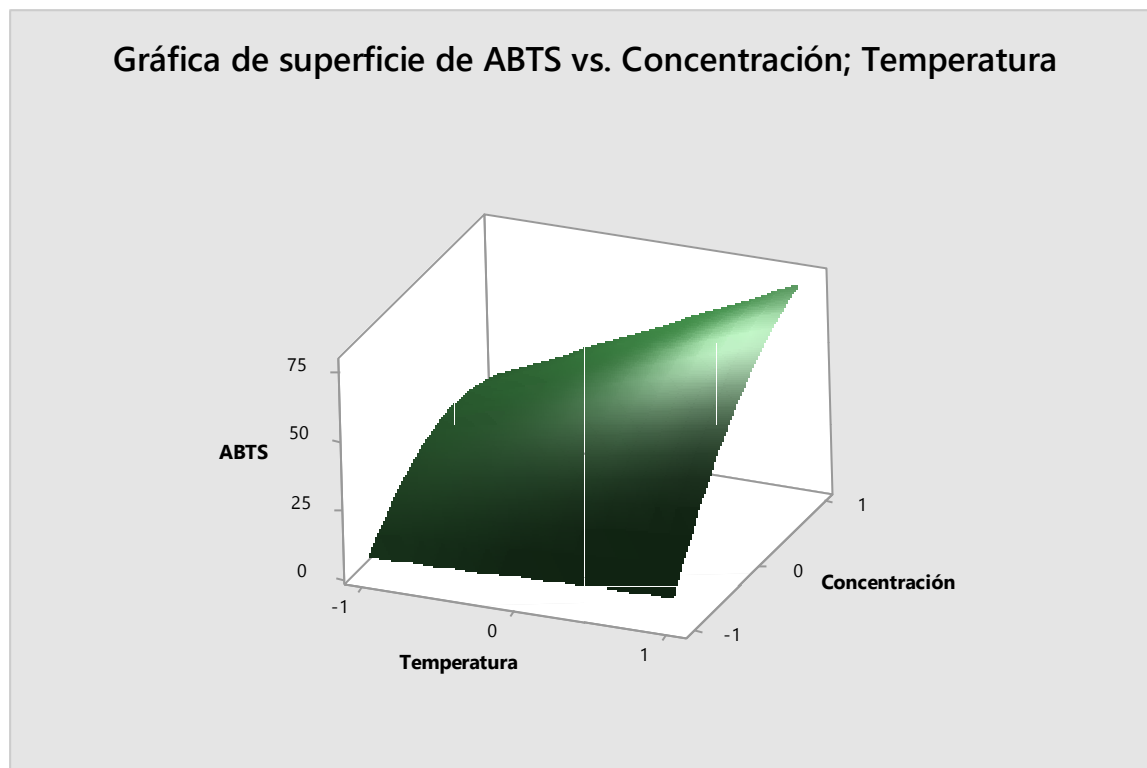


Figura 23. Superficie de respuesta para el método ABTS en unidades codificadas.

4.3.3. RSM ORAC

Los resultados del ensayo ORAC se encuentran en la Tabla 20. En este método, al igual que en los dos anteriores, el extracto con mayor capacidad antioxidante es el obtenido a 80 °C y 1,45% de hidróxido sódico, con $163,725 \pm 3,763$ mmol TE/g muestra húmeda. Sin embargo, se aprecia que para esta prueba la extracción a diferentes temperaturas parece ser mucho menos relevante que la concentración de hidróxido sódico, ya que el segundo extracto con mejor resultado es el de concentración alta y temperatura baja. Además, los extractos elaborados a 42 °C son superiores a sus equivalentes a otras temperaturas para las concentraciones de 0,05% y 0,75%.

Tabla 20. Comparación del efecto de la temperatura y la concentración de NaOH sobre la capacidad antioxidante (método ORAC). Los resultados que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Temperatura (°C)	Concentración NaOH (%)	Capacidad antioxidante ORAC ($\mu\text{mol TE/g}$ muestra húmeda)
80	0,05	$25,155^f \pm 1,078$
	0,75	$59,213^{d,e} \pm 0,931$
	1,45	$163,725^a \pm 3,763$
42	0,05	$47,075^e \pm 1,069$
	0,75	$103,445^c \pm 7,161$
	1,45	$115,938^c \pm 18,377$
4	0,05	$13,590^f \pm 2,149$
	0,75	$76,072^d \pm 8,002$
	1,45	$141,983^b \pm 18,851$

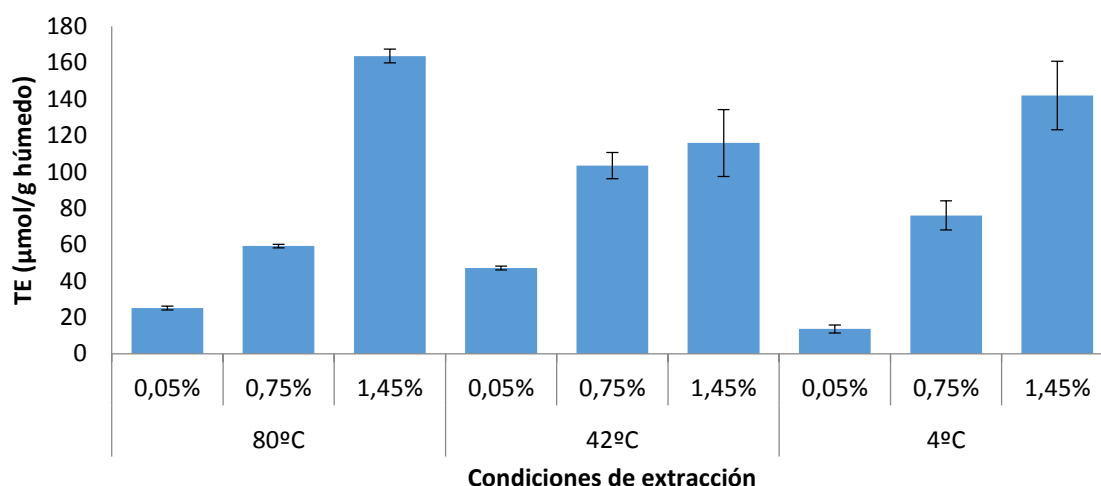


Figura 24. Comparación del efecto de la temperatura y la concentración de NaOH sobre la capacidad antioxidante (método ORAC). Los resultados que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tras aplicar la metodología de superficie de respuesta, se ajusta el sistema a un polinomio de segundo orden. En este caso, la ecuación favorece de forma clara la concentración de hidróxido sódico como factor más determinante. En cuanto a la temperatura, como puede observarse en la gráfica de contorno de la Figura 25, para valores bajos de concentración presenta un máximo en el valor intermedio (42 °C), pero conforme se incrementa la concentración la región de mayor capacidad antioxidante se desplaza ligeramente hacia las temperaturas más altas. Esto se corresponde con su aparición como término cuadrático y de signo negativo.

$$ORAC = 10,095 + 5,610[NaOH] - 2,323T^2 \quad (\text{Eq. 4.3})$$

La discrepancia en el ajuste de superficie de respuesta respecto a los obtenidos para los métodos Folin-Ciocalteu y ABTS puede explicarse por la diferencia de mecanismos de reacción. En el método ABTS, los compuestos con capacidad antirradicalaria han de neutralizar una molécula con elevado impedimento estérico como es el radical ABTS^{•+} (Schaich, Tian y Xie 2015). Por el contrario, en el método ORAC actúan o bien directamente sobre radicales peroxilo, o sobre la forma radical de la fluoresceína. Estos compuestos presenta un impedimento estérico mucho menor, lo que facilita la acción de las sustancias antirradicalarias.

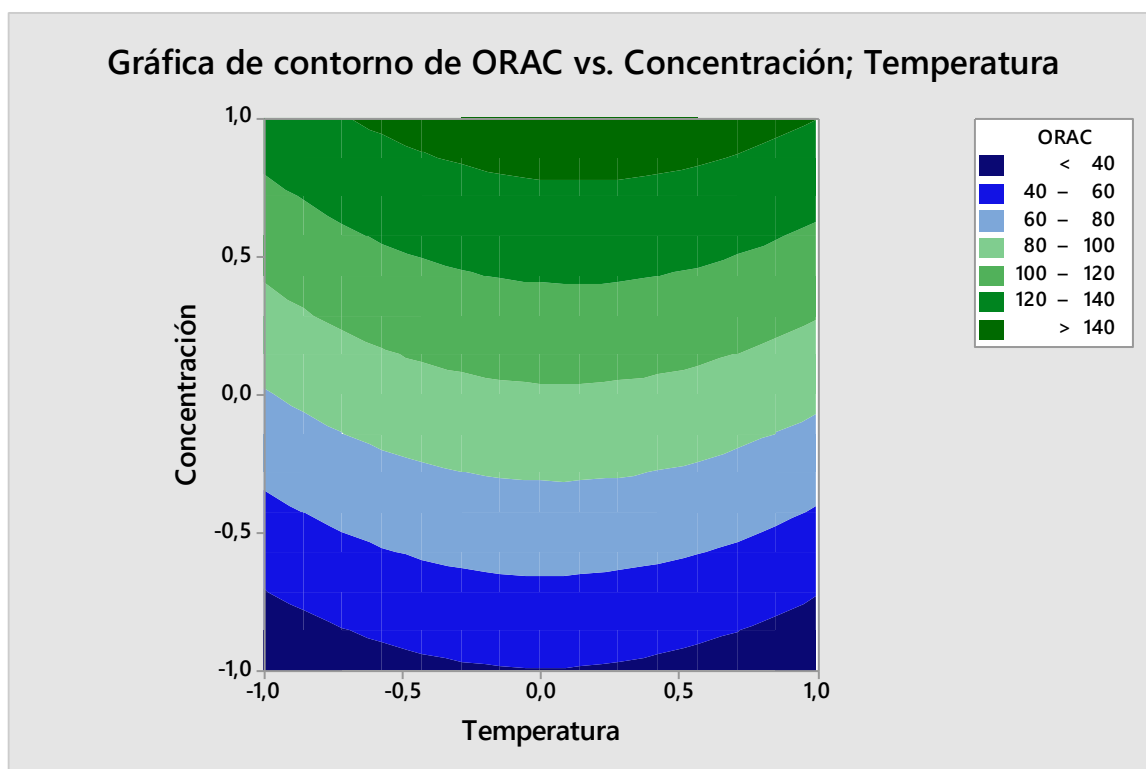


Figura 25. Gráfica de contorno del método ORAC en unidades codificadas

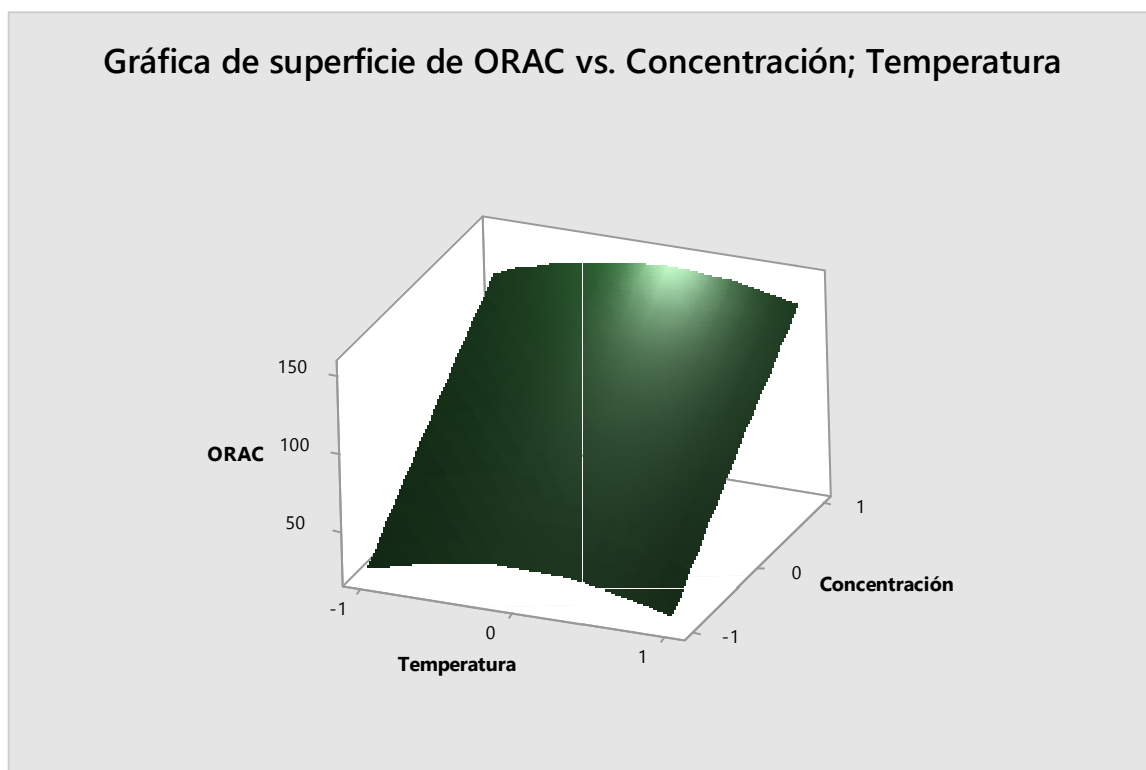


Figura 26. Superficie de respuesta para el método ORAC en unidades codificadas

4.4. Determinación de capacidad antioxidante

Una vez establecidas las condiciones de extracción óptimas (80 °C y 1,45% de NaOH) en el apartado anterior para la muestra Damm AB, se han utilizado nuevamente los tres ensayos de capacidad antioxidante (Folin-Ciocalteu, ABTS y ORAC) para caracterizar todas las muestras de bagazo.

4.4.1. Contenido fenólico Folin-Ciocalteu

En la Tabla 21 se muestra el contenido en polifenoles totales de las distintas muestras. El valor más elevado se obtiene para el extracto de bagazo de Estrella Galicia (38,833 ± 2,973 μmoles GAE/g muestra húmeda). Sin embargo, este resultado no es significativamente diferente del obtenido para el bagazo de Malta Artesana. En cuanto al extracto de Lúpulo Artesano, presenta un valor significativamente más bajo que todas las demás muestras.

Tabla 21. Comparación del TPC de distintas muestras de bagazo. Los resultados que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Muestra	Tipo de muestra	TPC (μmoles GAE/g muestra húmeda)
Estrella Galicia	BSG industrial	38,833 ^a ± 2,973
Damm 100P	BSG industrial	30,864 ^c ± 2,461
Damm AB	BSG industrial	30,148 ^c ± 0,641
1906	BSG industrial	33,338 ^{b,c} ± 1,483
Lúpulo Artesano	Lúpulo agotado	24,840 ^d ± 1,553
Malta Artesana	BSG artesanal	36,517 ^{a,b} ± 0,808

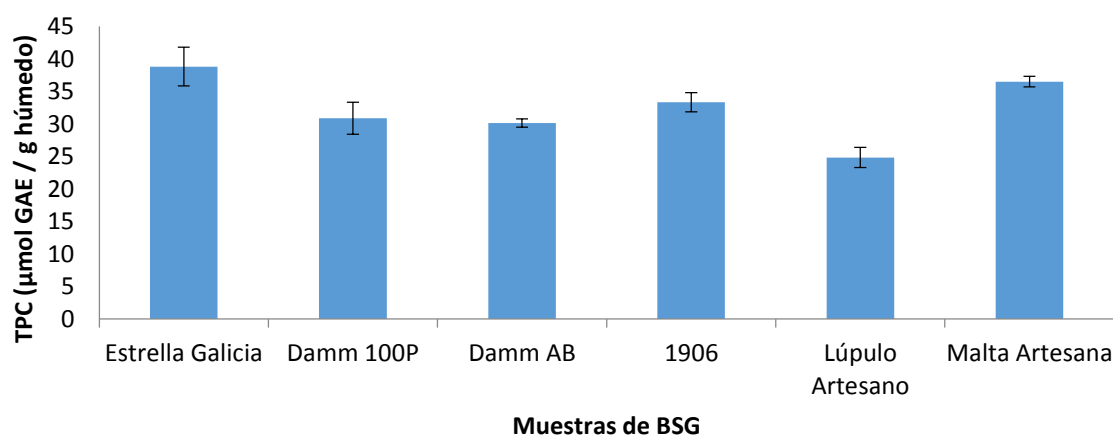


Figura 27. Comparación del TPC de distintas muestras de bagazo. Los resultados que no comparten una letra son significativamente diferentes.

4.4.2. ABTS

En la Tabla 22 se incluye la capacidad antioxidante medida mediante el método ABTS para las diferentes muestras de bagazo. En este caso, el extracto de Malta Artesana tiene los mejores resultados ($90,509 \pm 6,412 \mu\text{mol TE/g}$ muestra húmeda) pero sin diferencias significativas con Estrella Galicia y 1906 ($87,954 \pm 2,122$ y $87,365 \pm 5,516 \mu\text{mol TE/g}$ muestra húmeda respectivamente). La muestra de Lúpulo Artesano presenta los peores resultados, seguido de Damm 100P.

Tabla 22. Comparación de la capacidad antioxidante (método ABTS) de distintas muestras de bagazo. Los resultados que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Muestra	Tipo de muestra	Capacidad antioxidante ABTS ($\mu\text{mol TE/g}$ muestra húmeda)
Estrella Galicia	BSG industrial	$87,954^{a,b} \pm 2,122$
Damm 100P	BSG industrial	$66,807^{c,d} \pm 3,080$
Damm AB	BSG industrial	$75,740^{b,c} \pm 6,283$
1906	BSG industrial	$87,365^{a,b} \pm 5,516$
Lúpulo Artesano	Lúpulo agotado	$60,026^d \pm 1,297$
Malta Artesana	BSG artesanal	$90,509^a \pm 6,412$

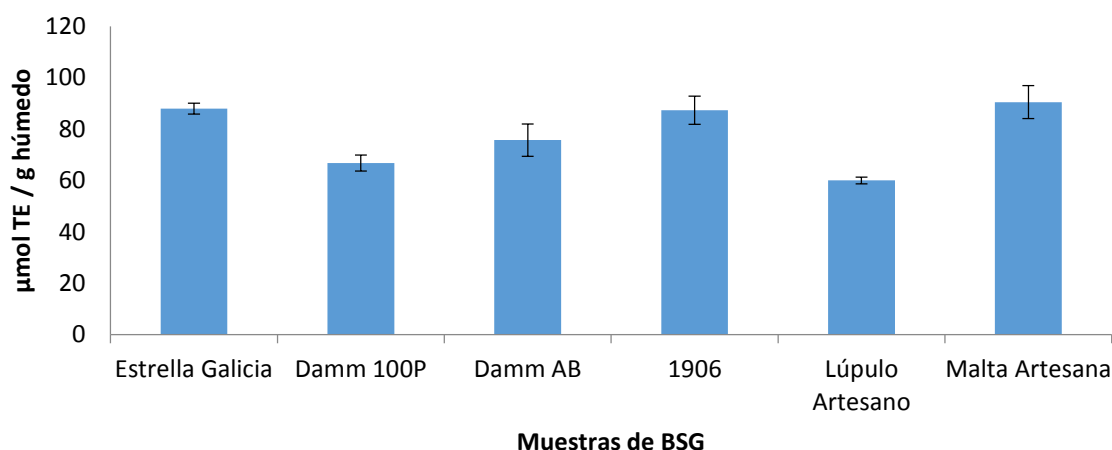


Figura 28. Comparación de la capacidad antioxidante (método ABTS) de distintas muestras de bagazo. Los resultados que no comparten una letra son significativamente diferentes.

4.4.3. ORAC

Los resultados del ensayo ORAC se recogen en la Tabla 23. En este caso, al igual que en el ABTS, la Malta Artesana vuelve a tener la mayor capacidad antioxidante ($188,614 \pm 11,96$ μmol TE/g muestra húmeda), y la muestra de 1906 está en segundo lugar pero sin mostrar diferencias significativas. La malta Damm 100P, con un resultado de $120,184 \pm 11,193$ μmol TE/g muestra húmeda, es la que presenta menos capacidad antioxidante en esta prueba, seguida por el bagazo de Estrella Galicia, del que no difiere significativamente.

Tabla 23. Comparación de la capacidad antioxidante (método ORAC) de distintas muestras de bagazo. Los resultados que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Muestra	Tipo de muestra	Capacidad antioxidante ORAC (μmol TE/g muestra húmeda)
Estrella Galicia	BSG industrial	$125,368^{c,d} \pm 15,763$
Damm 100P	BSG industrial	$120,184^d \pm 11,193$
Damm AB	BSG industrial	$145,521^{b,c,d} \pm 1,446$
1906	BSG industrial	$165,402^{a,b} \pm 7,183$
Lúpulo Artesano	Lúpulo agotado	$152,579^{b,c} \pm 8,238$
Malta Artesana	BSG artesanal	$188,614^a \pm 11,96$

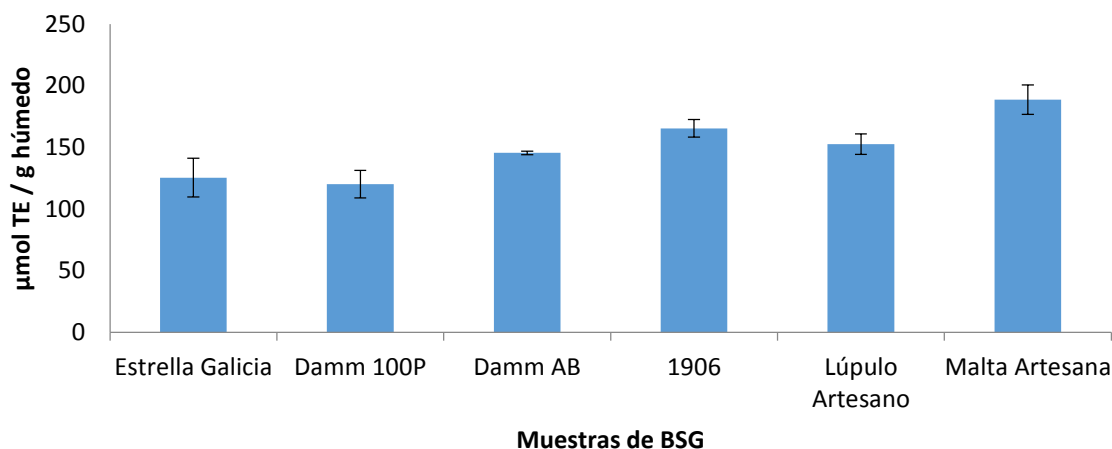


Figura 29. Comparación de la capacidad antioxidante (método ORAC) de distintas muestras de bagazo. Los resultados que no comparten una letra son significativamente diferentes.

4.5. Pruebas de oxidación de emulsiones

Para comprobar si el bagazo de malta tenía utilidad a la hora de ralentizar la oxidación en emulsiones de aceite en agua, se realizó un experimento previo. Para ello se comparó, mediante el ensayo de valor de peróxido, la formación de hidroperóxidos en una emulsión con un 10% de extracto añadido, frente a un control con 10% del disolvente utilizado en el extracto. Al obtener resultados favorables, se procedió a ampliar el experimento, siguiendo de forma periódica la evolución del proceso oxidativo.

Para esta prueba, las fuentes de antioxidantes utilizadas para proteger la emulsión son: un extracto de bagazo preparado a 80 °C y con hidróxido sódico al 1,45% (ya que presenta los mejores resultados en los tests Folin, ABTS y ORAC), y un film de PLA conteniendo bagazo liofilizado. Debido a que el film presenta dos caras diferenciadas en su aspecto (“lisa” y “rugosa”), se utilizará en dos emulsiones para probar ambas caras en contacto con la emulsión.

En la Figura 30 puede observarse que la emulsión que contiene extracto presenta un efecto antioxidante mucho mayor, sin mostrar apenas signos de oxidación a lo largo de 14 días. En cuanto a las emulsiones protegidas con films, en los primeros días aparece una oxidación inicial que sigue la tendencia del control, pero siempre manteniendo valores más bajos de valor de peróxido. Esto puede achacarse a la liberación gradual de los antioxidantes del film a la emulsión mediante difusión,

de manera que la oxidación en los primeros días se debe a que la concentración de antioxidantes es todavía muy baja.

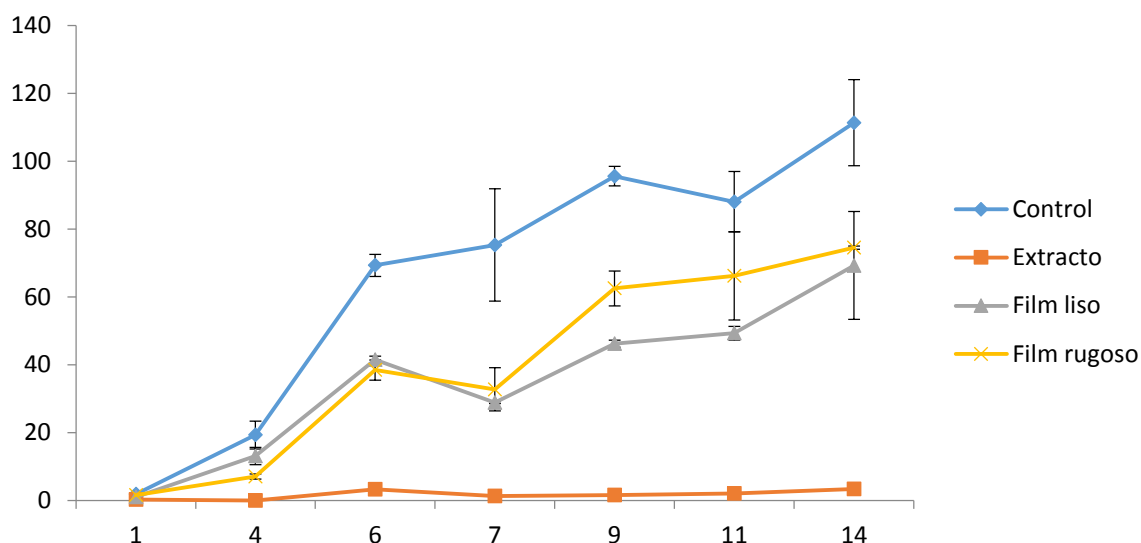


Figura 30. Evolución del proceso oxidativo en emulsiones con y sin bagazo de malta.

Tras 14 días, se comparan los valores de peróxido finales de las cuatro emulsiones en la Figura 31. Las emulsiones con extracto se han oxidado un 97% menos que el control. Mientras que se puede establecer una diferencia clara entre el uso de film, de extracto, y el control, no hay una diferencia significativa entre las dos caras del film. Por lo tanto puede afirmarse que es indiferente la cara del film que esté en contacto con la emulsión.

Tabla 24. Comparación del valor de peróxido de emulsiones con y sin bagazo de malta tras 14 días. Los resultados que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Emulsión	TE ($\mu\text{mol} / \text{g}$ muestra húmeda)
Control	$111,369^a \pm 12,704$
Con extracto	$3,347^c \pm 0,432$
Con film liso	$69,259^b \pm 15,906$
Con film rugoso	$74,524^b \pm 13,015$

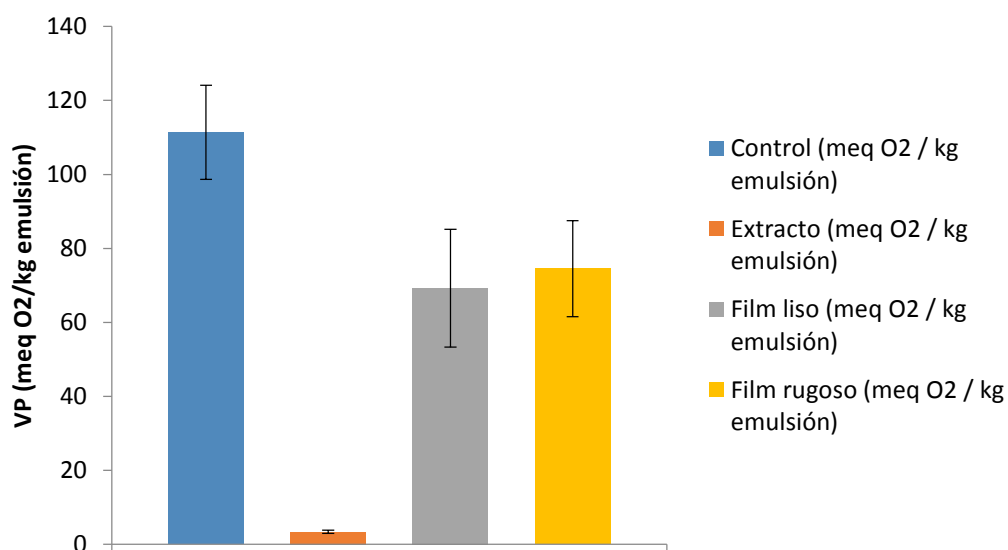


Figura 31. Comparación del valor de peróxido de emulsiones con y sin bagazo de malta tras 14 días. Los resultados que no comparten una letra son significativamente diferentes.

4.6. Pruebas de oxidación con carne

La adición de bagazo liofilizado a la carne no solo no presentó ningún efecto positivo sino que se observaron efectos prooxidantes, produciéndose una oxidación muy rápida de la carne que llevó a descartar el experimento.

4.7. Ensayos de difusividad con films

Al realizar los ensayos de difusividad descritos en el apartado 3.2.8.3, se descartaron los resultados al no observarse presencia significativa de antioxidante en los simulantes alimentarios. Por lo tanto no se ha podido calcular el coeficiente de difusividad de estos films.

4.8. Análisis mediante HPLC-DAD

A la hora de llevar a cabo los análisis cromatográficos mediante HPLC-DAD siguiendo el método desarrollado por Moreira et al. (2012), se encontró el problema de que la separación de picos no era la deseada. Esto puede achacarse a distintos factores: la columna empleada no es el mismo modelo que la del método original, se ha substituido el ácido fórmico por ácido acético, y las muestras tienen un origen distinto.

Para solventar este problema, se realizaron modificaciones sucesivas del gradiente del método, con el fin de mejorar la resolución de los picos de señal.

Una vez optimizado el método, se ha procedido a la identificación cualitativa de los picos observados. Para ello se han utilizado patrones de los principales ácidos fenólicos y polifenoles, determinando su tiempo de retención. A continuación, para aquellas sustancias de las que se ha comprobado su presencia, se ha llevado a cabo un análisis cuantitativo elaborando rectas de calibrado a partir de los patrones a distintas concentraciones.

4.8.1. Modificaciones del método cromatográfico

4.8.1.1. Modificaciones del gradiente

En primer lugar, se trató de optimizar la resolución a través de cambios en el gradiente de la fase móvil y manteniendo el resto de factores constantes. El principio en el que se han basado estas modificaciones es el de ralentizar el gradiente en el rango de interés.

Para ello, se ha identificado el intervalo de tiempo en el que aparecen los picos que supuestamente se corresponden con la elución de los compuestos fenólicos. A continuación, se ha interpolado el gradiente para calcular las concentraciones al principio y al final de este intervalo. De esta forma, se puede introducir un paso intermedio en el gradiente, que alargue el intervalo aumentando el tiempo requerido para avanzar entre estas dos concentraciones.

Al mismo tiempo, se ha acelerado la última etapa, en la que se alcanza el 100% de metanol y se eluyen los compuestos restantes. De esta forma se busca reducir la duración del método.

Tabla 25. Modificación del gradiente del método HPLC. Modificación 1.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	A (%)	B (%)
0	0,3	90	10
45	0,3	53	47
90	0,3	41	59
110	0,3	0	100
120	0,3	90	10

Tabla 26. Modificación del gradiente del método HPLC. Modificación 2.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	A (%)	B (%)
0	0,3	90	10
25	0,3	53	47
70	0,3	41	59
90	0,3	0	100
100	0,3	90	10

Tabla 27. Modificación del gradiente del método HPLC. Modificación 3.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	A (%)	B (%)
0	0,3	90	10
25	0,3	50	50
70	0,3	45	55
90	0,3	0	100
100	0,3	90	10

Tabla 28. Modificación del gradiente del método HPLC. Modificación 4.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	A (%)	B (%)
0	0,3	90	10
25	0,3	50	50
75	0,3	47	53
90	0,3	0	100
95	0,3	0	100
100	0,3	90	10

Pese a que cada modificación ofrecía resultados ligeramente mejores que el anterior gradiente en cuanto a separación de picos, al llegar a la cuarta y última versión las diferencias empezaron a ser insignificantes. Por lo tanto se detuvo este método de optimización y se estableció el último gradiente como la base para las siguientes modificaciones (Figura 32).

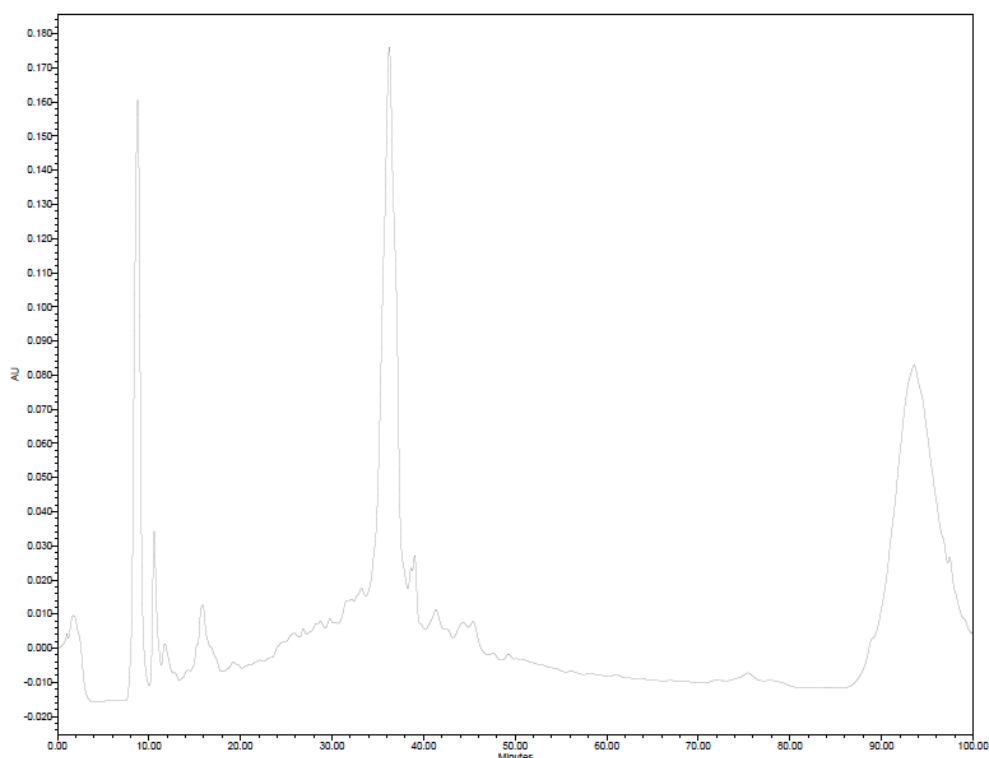


Figura 32. Cromatograma a 280 nm de la muestra Damm AB con la modificación 4 del gradiente.

4.8.1.2. Modificaciones del pH

En un primer momento, se adoptó el método cromatográfico de Moreira et al. 2013 substituyendo la fase acuosa, al utilizar ácido acético al 0,1% en lugar de ácido fórmico al 0,1%. Sin embargo, al calcular el pH se obtuvo que el ácido acético presentaba un pH de 3,26. Por el contrario, el pH esperado para la misma concentración de ácido fórmico sería de 2,68.

La diferencia de pH puede resultar significativa en este caso, ya que el pK_a de varios compuestos fenólicos esperados, como el ácido ferúlico o el sirínico (3,77 y 3,93), está próximo al pH de la disolución de acético al 0,1%. Por lo tanto estos compuestos podrían aparecer tanto en forma protonada como ionizados, dificultando su identificación.

Al operar a 1 unidad de pH por debajo del pK_a , se asegura que el 90% de estos ácidos estarán en su forma no ionizada, debido a la escala logarítmica del pH. A 2 unidades por debajo, sería un 99%, y así sucesivamente (Amersham 1999). En este caso se ajustará el pH a 1 unidad por debajo del pK_a del ácido ferúlico, 2,77. Para ello se utilizará una concentración del 0,8% de ácido acético. Se ha optado por no seguir bajando el pH para evitar ocasionar daños a la columna.

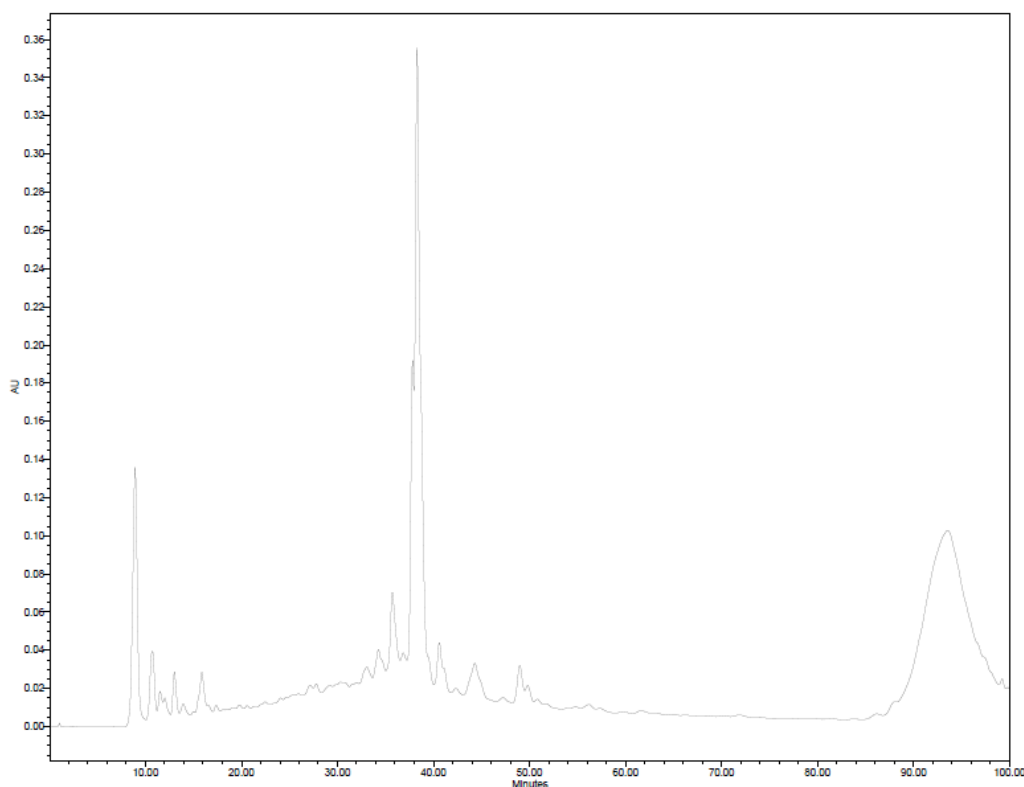


Figura 33. Cromatograma a 280 nm de la muestra Damm AB con el aumento de la concentración de ácido fórmico a 0,8%.

El resultado de esta modificación ha sido positivo ya que la resolución de los picos ha mejorado notablemente, reduciéndose su anchura y aumentando la altura, como se observa en la Figura 33. Esto resulta en un menor solapamiento de los picos que facilita su identificación. Por lo tanto se incorpora el cambio de pH al método para el último apartado de modificaciones.

4.8.1.3. Modificaciones de la fase orgánica

Las tres principales fases orgánicas utilizadas en HPLC son el metanol, el acetonitrilo y el tetrahidrofurano. Cada uno de estos disolventes presenta unas propiedades diferenciadas en la forma en la que interactúa con la muestra. Por lo tanto, una opción a la hora de modificar la elución de los compuestos de la muestra es probar a utilizar una fase orgánica diferente a la preestablecida, metanol en este caso.

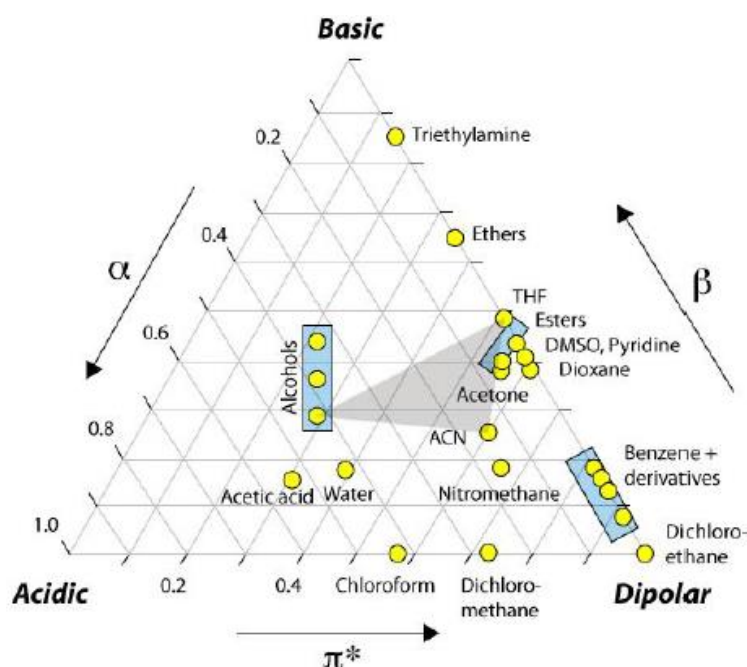


Figura 34. Triángulo de selectividad de disolventes para HPLC (Amersham 1999)

Sin embargo, además de variar las interacciones, cada disolvente tiene una fuerza distinta, con lo cual acelera o retrasa globalmente los tiempos de retención. Para obtener unos tiempos similares, se ha de modificar la relación entre fase acuosa y fase orgánica. En la Figura 35 se indica una estimación para realizar el cambio de composición en función de la fase orgánica utilizada. Esta estimación se utilizará para ajustar el gradiente para el uso de acetonitrilo manteniendo la misma fuerza de disolvente. En cuanto a la fase acuosa, se mantendrá el cambio a ácido acético 0,8% realizado en el apartado anterior.

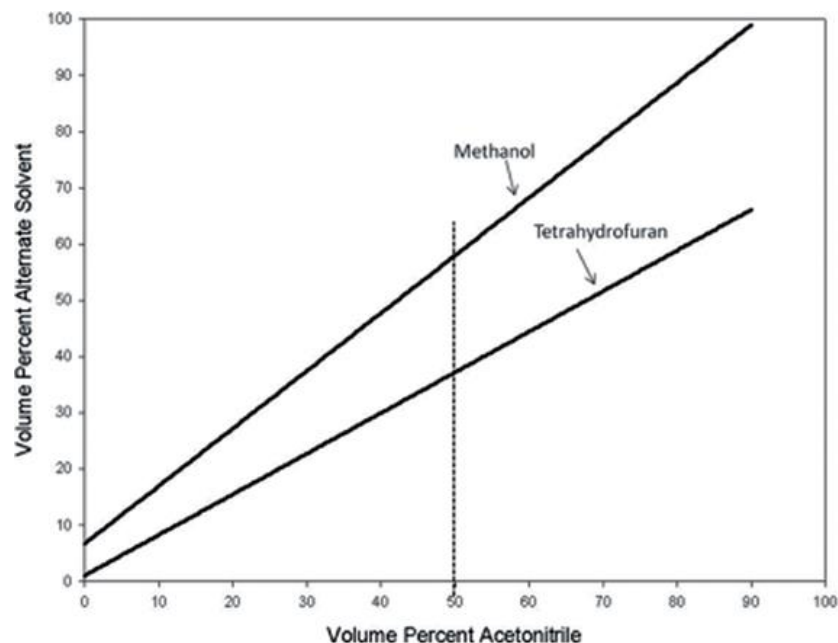


Figura 35. Relación entre la fuerza de distintas fases orgánicas utilizadas en HPLC (DeStefano, Joseph.J, Johnson 2015)

Aplicando estos cambios para el uso de metanol como fase orgánica, se obtiene un nuevo gradiente ajustado que se muestra en la Tabla 29. En los últimos pasos del gradiente se lleva la concentración de fase orgánica al 100% independientemente del cambio de disolvente, para garantizar la elución total de cualquier compuesto.

Tabla 29. Modificación del gradiente del método HPLC para el cambio de fase orgánica a acetonitrilo.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	A (%)	B (%)
0	0,3	97	3
25	0,3	63	37
75	0,3	60	40
90	0,3	0	100
95	0,3	0	100
100	0,3	97	3

El resultado ha sido desfavorable, ya que aunque el ajuste de la fuerza del disolvente ha sido correcto, los picos de señal se han apelotonado en lugar de ofrecer una mayor resolución. Por lo tanto se descarta el cambio de fase orgánica como método para optimizar la separación.

4.8.2. Cuantificación de ácido ferúlico

Una vez establecido el método óptimo para el análisis mediante HPLC, se ha cuantificado el principal pico de señal de las muestras, correspondiente al ácido ferúlico. Esta sustancia se eluye en el minuto 40, y está presente en todas las muestras a excepción del lúpulo. La muestra con mayor concentración de ácido ferúlico es Damm AB ($290,887 \pm 10,146$ mg/100 g muestra seca), pese a que el resultado no se puede considerar significativamente distinto del de Damm 100P ($257,495 \pm 18,768$ mg/100 g muestra seca). En este caso, la muestra con menor contenido en este compuesto fenólico es Estrella Galicia.

Los resultados hallados en la bibliografía para una extracción similar en disolución de NaOH son de $0,27 \pm 0,02$ % (m/m), es decir, 270 ± 2 mg/100 g muestra seca (Moreira et al. 2012). Por lo tanto, estos resultados son ligeramente superiores a lo esperado.

Tabla 30. Comparación del contenido total en ácido ferúlico de distintas muestras de bagazo. Los resultados que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Muestra	Tipo de muestra	Ácido ferúlico (mg/100 g muestra seca)
Estrella Galicia	BSG industrial	$156,553^c \pm 40,615$
Damm 100P	BSG industrial	$257,495^{a,b} \pm 18,768$
Damm AB	BSG industrial	$290,887^a \pm 10,146$
1906	BSG industrial	$217,17^{b,c} \pm 7,334$
Lúpulo Artesano	Lúpulo agotado	-
Malta Artesana	BSG artesanal	$188,743^c \pm 7,664$

4.9. Correlaciones

A continuación, una vez determinados los parámetros relacionados con la actividad antioxidante (TPC, capacidades antirradicalarias ABTS y ORAC, y contenido en ácido ferúlico), se procede a cruzar los resultados obtenidos para las distintas muestras con el objetivo de hallar alguna correlación entre

ellos. En el caso del ácido ferúlico, ya que la muestra de Lúpulo Artesano carece de este compuesto, se ha eliminado esta muestra para los cruces que incluyen este parámetro.

En la Tabla 31 se recoge el coeficiente de correlación R^2 para cada cruce. El único par de parámetros para el que se puede establecer una correlación fuerte es el ácido ferúlico con el TPC ($R^2 = 0,956$), seguido de la capacidad antirradicalaria ABTS con el TPC ($R^2 = 0,809$).

Tabla 31. Coeficientes de correlación R^2 entre distintos parámetros relacionados con la actividad antioxidante.

	TPC	ABTS	ORAC	Ácido ferúlico
TPC	-	-	-	-
ABTS	0,809	-	-	-
ORAC	0,007	0,179	-	-
Ácido ferúlico	0,956	0,601	0,034	-

En el caso de la correlación ácido ferúlico – TPC, presenta signo negativo (Figura 36): a mayor TPC menor cantidad de ácido ferúlico. Esto podría deberse a que el ácido ferúlico posee un solo grupo fenol, y por lo tanto tiene menos peso que los polifenoles en las reacciones de oxidación-reducción que tienen lugar en el ensayo Folin-Ciocalteu.

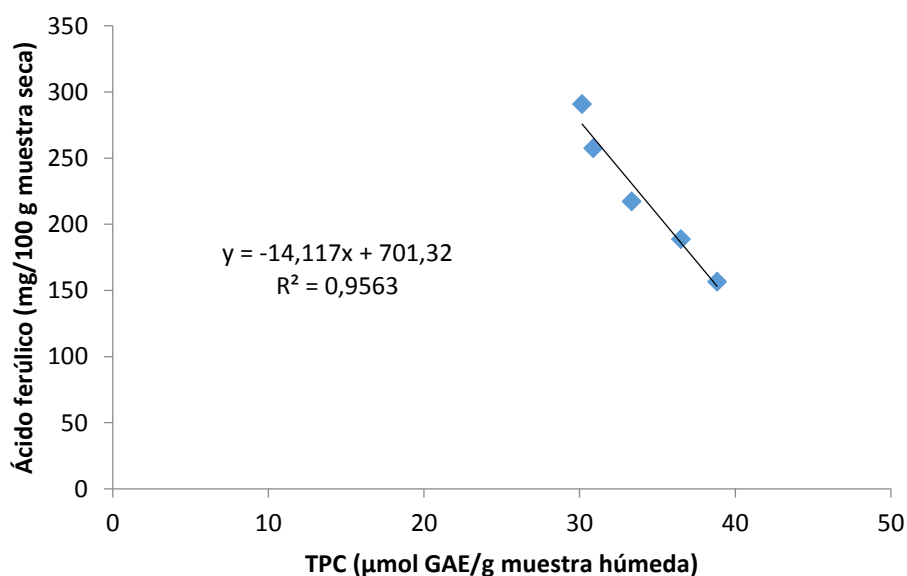


Figura 36. Correlación entre el ácido ferúlico y el TPC para las muestras de bagazo (lúpulo excluido).

Para la correlación ABTS – TPC, a mayor contenido fenólico total mayor es la capacidad antirradicalaria (Figura 37). Por lo tanto, en este caso se puede afirmar que el resultado del ensayo ABTS depende de la cantidad de polifenoles totales presentes en la muestra.

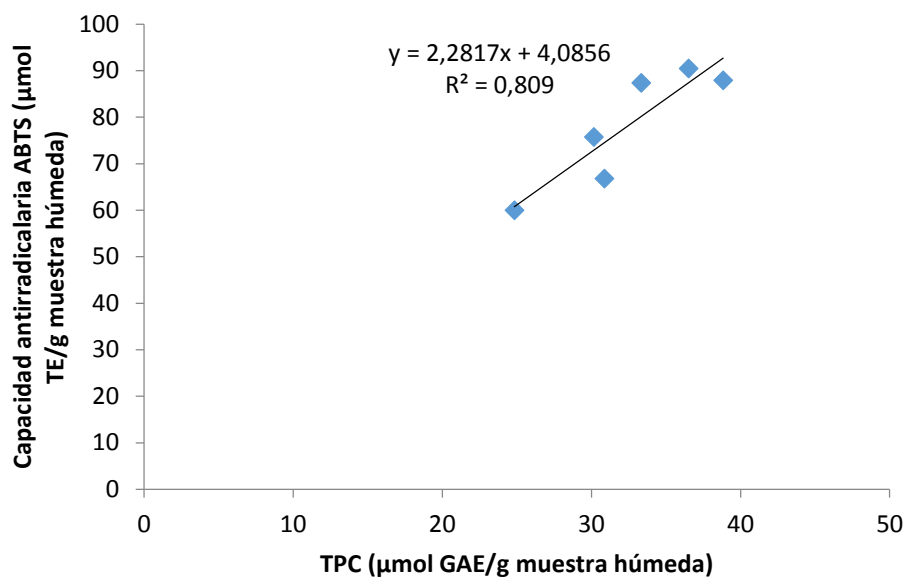


Figura 37. Correlación entre la capacidad antirradicalaria ABTS y el TPC para las muestras de bagazo.

5. Análisis de impacto ambiental

En el desarrollo de los experimentos incluidos en este proyecto se han generado residuos considerados perjudiciales para el medio ambiente. En la Tabla 32, se incluye una relación de estos residuos, así como el experimento del que proceden y las categorías en las que se separan para su posterior recogida y tratamiento por parte de una empresa externa.

Tabla 32. Tipos de residuos generados

Residuo	Tipo de residuo	Experimento
Etanol	Disolventes orgánicos no halogenados	Valoración de peróxidos
Ferrocianuro	Disolventes orgánicos con metales	Valoración de peróxidos
Ácido clorhídrico	Disoluciones ácidas	Valoración de peróxidos, TBARS
Ácido tiobarbitúrico	Disoluciones ácidas	TBARS
Ácido tricloroacético	Disoluciones ácidas	TBARS
Alúmina	Residuos de aceites	Filtración aceite
Emulsiones	Residuos de aceites	Valoración de peróxidos
Restos de carne	Sólidos bio-peligrosos	TBARS
Metanol	Disolventes orgánicos no halogenados	HPLC, extracción de polifenoles
Acetonitrilo	Disolventes orgánicos no halogenados	HPLC
Acetona	Disolventes orgánicos no halogenados	Extracción de polifenoles
Reactivo de Folin-Ciocalteu	Disoluciones ácidas	Ensayo Folin-Ciocalteu

Conclusiones

- Se han caracterizado las muestras de bagazo de malta, observándose la ausencia de glucosa en todas ellas. La muestra más rica en proteínas y cenizas ha sido el bagazo Damm 100P, con un total de $24,562 \pm 1,132$ mg de proteína /g muestra húmeda, así como un 2,94% (m/m) en cenizas.
- De entre los distintos disolventes utilizados, el óptimo para la extracción de polifenoles ha sido una disolución de hidróxido sódico.
- Se ha analizado el contenido en polifenoles totales mediante el método Folin-Ciocalteu. La muestra con mayor TPC es el bagazo de Estrella Galicia ($38,833 \pm 2,973$ $\mu\text{mol GAE/g}$ muestra húmeda).
- Se ha determinado la actividad antirradicalaria mediante los métodos ABTS y ORAC. El bagazo de Malta Artesana se puede considerar el más efectivo, ya que presenta la mayor actividad antioxidante según el método ORAC ($188,614 \pm 11,96$ $\mu\text{mol TE/g}$ muestra húmeda) y según el método ABTS ($90,509 \pm 6,412$ $\mu\text{mol TE/g}$ muestra húmeda). Además, su contenido fenólico ($36,517 \pm 0,808$ $\mu\text{mol GAE/g}$ muestra húmeda) es el segundo mejor y no difiere significativamente del bagazo de Estrella Galicia.
- A través de la metodología de superficie de respuesta, se han establecido las mejores condiciones de extracción 80 °C y 1,45% de hidróxido sódico, según los ensayos Folin-Ciocalteu y ABTS, aplicables al rango estudiado. Sin embargo, no se puede hablar de un punto óptimo propiamente dicho, ya que se trata de los límites superiores de ambos parámetros. Es probable que temperaturas y concentraciones superiores ofrecieran resultados mejores.
- El máximo encontrado en la RSM para el método ORAC está en 42 °C. La causa de esta discrepancia con los métodos anteriores puede estar en que el método ORAC depende de radicales con menor impedimento estérico que el ABTS. Otra explicación sería la posible descomposición térmica al alcanzar los 80 °C de antioxidantes que tengan mayor influencia antirradicalaria en la prueba ORAC.
- Se ha cuantificado el contenido en ácido ferúlico de las muestras, presentando la mayor concentración el bagazo de Damm AB, con $290,887 \pm 10,146$ mg/100 g secos.
- La muestra de Lúpulo Artesano, al no ser un bagazo de malta, ha presentado resultados bastante diferentes al resto de muestras. Fundamentalmente, destaca la ausencia de ácido ferúlico, que es el principal compuesto antioxidante en las otras muestras. Su contenido fenólico total es el más bajo de las muestras analizadas, así como su actividad antirradicalaria mediante ABTS. Sin embargo sus resultados en el ORAC la sitúan en tercera posición. Por lo

tanto, se concluye que sí posee actividad antioxidante, pero que debería analizarse de una forma separada con un método apropiado para su diferente composición.

- Se ha empleado el bagazo de malta para la protección frente a la oxidación de emulsiones. La adición de extracto de bagazo ofrece una disminución del 97% en la formación de hidroperóxidos tras 14 días, mientras que la aplicación de un film elaborado con bagazo presenta una disminución del 35%.
- Se ha analizado la adición directa de bagazo de malta a muestras de carne mediante el método TBARS. No ha presentado ningún efecto positivo en las concentraciones empleadas, observándose una oxidación extremadamente rápida que hace sospechar de un efecto prooxidante.
- Se ha observado una correlación inversamente proporcional entre la concentración de ácido ferúlico y el contenido fenólico total, con una R^2 de 0,956. Esto podría indicar que en la prueba de Folin-Ciocalteu para determinar el TPC los ácidos fenólicos de pequeño tamaño como el ferúlico tienen poco peso frente a antioxidantes con múltiples grupos fenol. Por otra parte se ha establecido una correlación directa ($R^2 = 0,809$) entre la actividad antirradicalaria ABTS y el TPC.

Presupuesto

Este apartado es un desglose del coste económico asociado a la realización de este proyecto. Se incluyen los gastos asociados al material fungible, el material de laboratorio, equipos y reactivos, así como el consumo de agua y electricidad y el coste de personal.

Material fungible

Se incluye en este apartado todo aquel material con una vida útil de un solo uso.

Tabla 33. Presupuesto de material fungible

Material	Precio por lote (€)	Lote (uds)	Precio total (€)
Eppendorf 1 mL	9,75	1000	19,50
Guantes de nitrilo	3,49	100	6,98
Puntas pipeta automática (20-200 µL)	10,00	1000	20,00
Puntas pipeta automática (100-1000 µL)	4,14	1000	8,28
Papel de aluminio	1,50	1	1,50
Cinta adhesiva	0,60	1	0,60
Etiquetas adhesivas	1,00	100	1,00
Filtros 0,2 µm PTFE	119,70	50	119,70
Pipetas Pasteur	9,75	250	9,75
Vial HPLC	52,10	100	52,10
Cubeta de plástico (4,5 mL)	27,50	100	27,50
Total			266,91

Material básico de laboratorio

Este material presenta una durabilidad mayor que el material fungible, y por lo tanto el coste que suponen al proyecto se calcula como la amortización a lo largo de la parte proporcional de su vida útil durante la que se han utilizado (se ha estimado 1 año).

Tabla 34. Presupuesto de material de laboratorio

Material	Precio por unidad (€)	Unidades	Vida útil (años)	Coste anual (€)
Bata	15,00	1	2	7,50
Gafas	5,00	1	2	2,50
Matraz aforado (10 mL)	2,16	4	4	2,16
Matraz aforado (25 mL)	2,43	4	4	2,43
Matraz aforado (50 mL)	2,45	1	4	0,61
Matraz aforado (100 mL)	2,76	1	4	0,69
Matraz aforado (500 mL)	4,78	1	4	1,20
Probeta (5 mL)	3,19	3	4	2,39
Probeta (10 mL)	3,88	6	4	5,82
Probeta (500 mL)	15,72	1	4	3,93
Pipeta automática (20-200 µL)	60,95	1	2	30,48
Pipeta automática (100-1000 µL)	60,95	1	2	30,48
Pipeta multicanal	325,00	1	4	81,25
Embudo	4,78	6	4	7,17
Gradilla	4,20	1	2	2,10
Microplaca de 96 pozos	4,17	6	0,5	50,04
Total				230,74

Equipos e instrumentos

Los equipos e instrumentos utilizados en el proyecto tienen una vida útil superior a la del material de laboratorio. El cálculo presupuestario es el mismo que en el apartado anterior.

Tabla 35. Presupuesto de equipos e instrumentos

Equipo	Precio (€)	Unidades	Vida útil (años)	Coste anual (€)
Congelador	1698,00	1	10	169,80
Nevera	300,00	1	10	30,00
Estufa	2,16	2	8	0,54
Sonicador	2,43	1	8	0,30
Baño de ultrasonidos	931,50	1	10	93,15
Baño de aceite	20,00	1	10	2,00
Baño de agua	294,31	1	10	29,43
Espectrofotómetro	5600,00	1	10	560,00
Fluorímetro	19600,00	1	10	1960,00
Bomba	211,15	1	10	21,12
Medidor de pH	218,00	1	6	36,33
Balanza analítica	123,40	1	10	12,34
Centrífuga	1797,05	2	10	359,41
Agitador magnético	456,17	2	6	152,06
Total				3.426,48

Reactivos

El coste de los reactivos es función de su precio (según Sigma-Aldrich) y la cantidad utilizada.

Tabla 36. Presupuesto de reactivos

Reactivo	Cantidad	Precio	Precio total (€)
Metanol	3 L	16,40 €/L	49,2
Acetonitrilo	100 mL	109,50 €/L	10,95
Hidróxido sódico	100 g	62,50 €/kg	6,25
Trolox 0,5 µM	5 mL	29,00 €/mg	0,02
Ácido gálico	1 g	6,67 €/g	6,67
Ácido ferúlico	10 mg	1,09 €/mg	10,09
PBS	1 L	7,56 €/L	7,56
ABTS	1 g	34,50 €/g	34,5
AAPH	1 g	1,45 €/g	1,45
Fluoresceína	1 g	9,88 €/g	9,88
Persulfato de potasio	2 g	10,86 €/g	10,86
Cloruro de hierro (III)	1 g	6,50 €/g	6,59
Ácido clorhídrico 37%	25 mL	21 €/L	0,53
Tiocianato amónico	1 g	160,10 €/kg	0,16
Óxido de aluminio	600 g	117,20 €/kg	70,32
Ácido tricloroacético	10 g	3,34 €/g	33,40
Ácido tiobarbitúrico	10 g	2,31 €/g	23,10
Reactivo de Folin-Ciocalteu	10 mL	172,40 €/L	1,72
Carbonato sódico	8 g	103,50 €/kg	0,828
Total			284,08

Consumo de agua

Se aplican las cuotas de 2017 de Aigües de Barcelona, suponiendo un consumo de 0,1 m³/h durante 800 horas.

Tabla 37. Presupuesto de consumo de agua

Concepto	Caudal (m ³ /h)	Tiempo (h)	Precio	Precio total (€)
Cuota de servicio	>1	800	10,16 €/mes	101,60
Consumo de agua	0,1	800	0,9073 €/m ³	72,58
IVA (10%)				17,42
Total				191,60

Consumo eléctrico

Se aplica la tarifa eléctrica de 2017, suponiendo una potencia contratada de 3,45 kW y un consumo de 60 kWh. Se ha estimado que la duración del proyecto corresponde a 280 días.

Tabla 38. Presupuesto de consumo eléctrico

Concepto	Potencia / Consumo	Tiempo (días)	Precio	Precio total (€)
Término fijo	3,45 kW	280	0,112757 €/kW día	108,92
Consumo eléctrico	60 kWh	280	0,119642 €/kWh	7,18
Impuesto eléctrico (5,11%)				5,94
IVA (21%)				25,63
Total				147,67

Coste de personal

Se ha considerado que el personal necesario sería un proyectista trabajando por la duración completa del proyecto, y un técnico trabajando por las horas de laboratorio. La cuota de la seguridad social se ha estimado en un 32%.

Tabla 39. Presupuesto de personal

Concepto	Horas trabajadas	Salario (€/h)	Salario (€)	Seguridad social (€)	Precio total (€)
Proyectista	800	12,50	10.000,00	3.200,00	13.200,00
Técnico de laboratorio	200	8,85	1.770,00	566,40	2.266,40
Total					15.466,40

Coste total

El coste total del proyecto se sitúa en los 20.013,88 €, del cual un 77% serían los gastos en personal.

Tabla 40. Presupuesto global del proyecto

Concepto	Precio total (€)
Material fungible	266,91
Material básico de laboratorio	230,74
Equipos e instrumentos	3.426,48
Reactivos	284,08
Consumo de agua	191,60
Consumo eléctrico	147,67
Coste de personal	15.466,40
Total	20.013,88

Bibliografia

- AINSWORTH, E.A. y GILLESPIE, K.M., 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. En: 10.1038/nprot.2007.102, *Nat. Protocols* [en línea], vol. 2, no. 4, pp. 875-877. ISSN 1754-2189. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2007.102>.
- ALIYU, S. y BALA, M., 2013. Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. *African Journal of Biotechnology* [en línea], vol. 10, no. 3, pp. 324-331. ISSN 1684-5315. DOI 10.4314/ajb.v10i3. Disponible en: <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/92219>.
- AMERSHAM, 1999. Reversed Phase Chromatography. *Amersham Biosciences*, pp. 93117-93117. ISSN 18113416.
- ARON, P. y SHELLHAMMER, T., 2010. A discussion of polyphenols in beer physical and flavour stability. *Journal of the Institute of Brewing* [en línea], vol. 116, no. 4, pp. 369-380. ISSN 00469750. DOI 10.1002/j.2050-0416.2010.tb00788.x. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.2010.tb00788.x/abstract>.
- BRITISH STANDARD, 2002. BS EN 1186 - 1 : 2002 - Materials and articles in contact with foodstuffs - Plastics. ,
- CUVELIER, M.-E., RICHARD, H. y BERSET, C., 1992. Comparison of the Antioxidative Activity of Some Acid-phenols: Structure-Activity Relationship. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, vol. 56, no. 2, pp. 324-325. ISSN 0916-8451. DOI 10.1271/bbb.56.324.
- DESTEFANO, JOSEPH.J, JOHNSON, W.. E. Al, 2015. Methods for Changing Peak Resolution in HPLC; advantages and limitations. *Chromatographyonline* [en línea], vol. 31, no. 4, pp. 10-18. [Consulta: 13 septiembre 2017]. Disponible en: <http://www.chromatographyonline.com/methods-changing-peak-resolution-hplc-advantages-and-limitations>.
- EUMANN, M. y SCHILDBACH, S., 2012. 125th anniversary review: Water sources and treatment in brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 118, no. 1, pp. 12-21. ISSN 00469750. DOI 10.1002/jib.18.
- FĂRCAȘ, A.C., SOCACI, S.A., DULF, F. V., TOFANĂ, M., MUDURA, E. y DIACONEASA, Z., 2015. Volatile profile, fatty acids composition and total phenolics content of brewers' spent grain by-product with potential use in the development of new functional foods. *Journal of Cereal Science*, vol. 64, pp. 34-42. ISSN 10959963. DOI 10.1016/j.jcs.2015.04.003.
- GÜLÇİN, I., 2012. Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Archives of Toxicology*, vol. 86, no. 3, pp. 345-391. ISSN 03405761. DOI 10.1007/s00204-011-0774-2.
- HE, Y., DONG, J., YIN, H., ZHAO, Y., CHEN, R., WAN, X., CHEN, P., HOU, X., LIU, J. y CHEN, L., 2014. Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and ester formation of beer - A review. *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 120, no. 3, pp. 157-163. ISSN 20500416. DOI 10.1002/jib.145.

- HUANG, D., BOXIN, O.U. y PRIOR, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 53, no. 6, pp. 1841-1856. ISSN 00218561. DOI 10.1021/jf030723c.
- KANAUCHI, O., MITSUYAMA, K. y ARAKI, Y., 2001. Development of a functional germinated barley foodstuff from brewer's spent grain for the treatment of ulcerative colitis. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, vol. 59, pp. 59-62.
- KIRIN BEER UNIVERSITY REPORT, 2015. Kirin Beer University Report Global Beer Consumption by Country in 2014 | News Releases | Kirin Holdings. .
- KITRYTE, V., ŠADUIKIS, A. y VENSUTONIS, P.R., 2015. Assessment of antioxidant capacity of brewer's spent grain and its supercritical carbon dioxide extract as sources of valuable dietary ingredients. *Journal of Food Engineering*, vol. 167, pp. 18-24. ISSN 02608774. DOI 10.1016/j.foodeng.2014.12.005.
- LITESCU, S.C., EREMIA, S.A. V, TACHE, A., VASILESCU, I. y RADU, G.L., 2014. *The Use of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) Assays in the Assessment of Beverages' Antioxidant Properties* [en línea]. S.l.: Elsevier. ISBN 9780124047389. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-404738-9.00025-8>.
- LODOLO, E.J., KOCK, J.L.F., AXCELL, B.C. y BROOKS, M., 2008. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* - The main character in beer brewing. *FEMS Yeast Research*, vol. 8, no. 7, pp. 1018-1036. ISSN 15671356. DOI 10.1111/j.1567-1364.2008.00433.x.
- LÓPEZ DE DICASTILLO, C., NERÍN, C., ALFARO, P., CATALÁ, R., GAVARA, R. y HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P., 2011. Development of new antioxidant active packaging films based on ethylene vinyl alcohol copolymer (EVOH) and green tea extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 59, no. 14, pp. 7832-7840. ISSN 00218561. DOI 10.1021/jf201246g.
- MAILLARD, M.-N., SOUM, M.-H., BOIVIN, P. y BERSET, C., 1996. Antioxidant Activity of Barley and Malt: Relationship with Phenolic Content. *LWT - Food Science and Technology* [en línea], vol. 29, no. 3, pp. 238-244. ISSN 00236438. DOI 10.1006/food.1996.0035. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643896900353>.
- MCCARTHY, A.L., O'CALLAGHAN, Y.C., CONNOLLY, A., PIGGOTT, C.O., FITZGERALD, R.J. y O'BRIEN, N.M., 2012. Phenolic extracts of brewers' spent grain (BSG) as functional ingredients - Assessment of their DNA protective effect against oxidant-induced DNA single strand breaks in U937 cells. *Food Chemistry* [en línea], vol. 134, no. 2, pp. 641-646. ISSN 03088146. DOI 10.1016/j.foodchem.2012.02.133. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.133>.
- MENESES, N.G.T., MARTINS, S., TEIXEIRA, J.A. y MUSSATTO, S.I., 2013. Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. *Separation and Purification Technology* [en línea], vol. 108, pp. 152-158. ISSN 13835866. DOI 10.1016/j.seppur.2013.02.015. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2013.02.015>.
- MIKYŠKA, A. y HRABAK, M., 2002. The role of malt and hop polyphenols in beer quality, flavour and haze stability. *Journal of the Institute of Brewing* [en línea], vol. 108, no. 1, pp. 78-85. ISSN 00469750. DOI 10.1002/j.2050-0416.2002.tb00128.x. Disponible en:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.2050-0416.2002.tb00128.x/abstract>.

- MOREIRA, M.M., MORAIS, S., BARROS, A.A., DELERUE-MATOS, C. y GUIDO, L.F., 2012. A novel application of microwave-assisted extraction of polyphenols from brewer's spent grain with HPLC-DAD-MS analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 403, no. 4, pp. 1019-1029. ISSN 16182642. DOI 10.1007/s00216-011-5703-y.
- MOREIRA, M.M., MORAIS, S., CARVALHO, D.O., BARROS, A.A., DELERUE-MATOS, C. y GUIDO, L.F., 2013. Brewer's spent grain from different types of malt: Evaluation of the antioxidant activity and identification of the major phenolic compounds. *Food Research International* [en línea], vol. 54, no. 1, pp. 382-388. ISSN 09639969. DOI 10.1016/j.foodres.2013.07.023. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.023>.
- MURESAN, V. y MUSTE, S., 2010. Determination of peroxide value in sunflower halva using a spectrophotometric method. ... of University of ... [en línea], vol. 67, no. 2, pp. 334-339. Disponible en: <http://journals.usamvcluj.ro/index.php/agriculture/article/view/5116>.
- MUSSATTO, S.I., DRAGONE, G. y ROBERTO, I.C., 2006. Brewers' spent grain: Generation, characteristics and potential applications. *Journal of Cereal Science*, vol. 43, no. 1, pp. 1-14. ISSN 07335210. DOI 10.1016/j.jcs.2005.06.001.
- NIST/SEMATECH, 2012. e-Handbook of Statistical Methods. *e-Handbook of Statistical Methods*, DOI statistics.
- OLADOKUN, O., TARREGA, A., JAMES, S., SMART, K., HORT, J. y COOK, D., 2016. The impact of hop bitter acid and polyphenol profiles on the perceived bitterness of beer. *Food Chemistry* [en línea], vol. 205, pp. 212-220. ISSN 18737072. DOI 10.1016/j.foodchem.2016.03.023. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.023>.
- PALMER, J.J., 2006. *How to Brew: Everything You Need To Know To Brew Beer Right The First Time: John J. Palmer* [en línea]. S.l.: s.n. ISBN 978-0937381885. Disponible en: <http://www.amazon.com/How-Brew-Everything-Right-First/dp/0937381888>.
- PETERSON, D.M., 1994. *Barley tocols - Effects of milling, malting, and mashing*. 1994. S.l.: s.n.
- POPESCU, V., SOCEANU, A., DOBRINAS, S. y STANCIU, G., 2013. A study of beer bitterness loss during the various stages of the Romanian beer production process. *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 119, no. 3, pp. 111-115. ISSN 20500416. DOI 10.1002/jib.82.
- PRODUCTS, H. y NEWS, C.D., 2014. TBARS Assay Kit. , vol. 38, no. 1993, pp. 9-10.
- SCHAICH, K.M., TIAN, X. y XIE, J., 2015. Reprint of «Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays». *Journal of Functional Foods* [en línea], vol. 18, no. April, pp. 782-796. ISSN 17564646. DOI 10.1016/j.jff.2015.05.024. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.043>.
- SCHÖNBERGER, C. y KOSTELECKY, T., 2011. 125th Anniversary Review: The Role of Hops in Brewing. *Journal of the Institute of Brewing* [en línea], vol. 117, no. 3, pp. 259-267. ISSN 00469750. DOI 10.1002/j.2050-0416.2011.tb00471.x. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00471.x>.

- SERENA, A. y KNUDSEN, K., 2007. Chemical and physicochemical characterisation of co-products from vegetable food and agro industries. *Animal Feed Science and Technology - ANIM FEED SCI TECH*, vol. 139, pp. 109-124.
- SERPEN, A., CAPUANO, E., FOGLIANO, V. y GÖKMEN, V., 2007. A new procedure to measure the antioxidant activity of insoluble food components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, no. 19, pp. 7676-7681. ISSN 00218561. DOI 10.1021/jf071291z.
- VANDERHAESEN, B., NEVEN, H., VERACHTERT, H. y DERDELINCKX, G., 2006. The chemistry of beer aging - A critical review. *Food Chemistry*, vol. 95, no. 3, pp. 357-381. ISSN 03088146. DOI 10.1016/j.foodchem.2005.01.006.

Anexo A. Análisis estadístico

El análisis estadístico realizado en cada caso se ha llevado a cabo mediante el software Minitab 17. Se han determinado las diferencias significativas entre medias, con un nivel de confianza del 95%. El método empleado es el ANOVA unifactorial con test de Tukey.

A1. Determinación del disolvente óptimo

ANOVA unidireccional: Agua; NaOH; MeOH; MeOH HCl; Acetona

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	5	Agua; NaOH; MeOH; MeOH HCl; Acetona

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	4	433,332	108,333	248,97	0,000
Error	13	5,657	0,435		
Total	17	438,988			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,659642	98,71%	98,31%	97,71%

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Agua	4	0,3828	0,0890	(-0,3297; 1,0954)
NaOH	4	13,244	1,359	(12,532; 13,957)
MeOH	4	1,8552	0,1342	(1,1426; 2,5677)
MeOH HCl	3	1,4500	0,0996	(0,6272; 2,2727)
Acetona	3	3,1707	0,0941	(2,3480; 3,9935)

Desv.Est. agrupada = 0,659642

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 94%



Factor	N	Media	Agrupación
NaOH	4	13,244	A
Acetona	3	3,1707	B
MeOH	4	1,8552	B C
MeOH HCl	3	1,4500	C D
Agua	4	0,3828	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

A2. Análisis de superficie de respuesta – Folin-Ciocalteu

Diseño central compuesto

Factores:	2	Réplicas:	3
Corridas base:	13	Total de corridas:	39
Bloques base:	1	Total de bloques:	1

Factorial de dos niveles: Factorial completo

Puntos del cubo:	12
Puntos centrales en el cubo:	15
Puntos axiales:	12
Puntos centrales en axial:	0

α : 1

Regresión de superficie de respuesta: Polifenoles totales vs. Temperatura; Concentración

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	5	2526,57	505,31	246,56	0,000
Lineal	2	1844,85	922,42	450,08	0,000
Temperatura	1	667,30	667,30	325,60	0,000
Concentración	1	1177,54	1177,54	574,56	0,000
Cuadrado	2	486,51	243,26	118,69	0,000
Temperatura*Temperatura	1	27,03	27,03	13,19	0,001
Concentración*Concentración	1	318,22	318,22	155,27	0,000
Interacción de 2 factores	1	195,21	195,21	95,25	0,000
Temperatura*Concentración	1	195,21	195,21	95,25	0,000
Error	33	67,63	2,05		
Falta de ajuste	3	32,68	10,89	9,35	0,000
Error puro	30	34,96	1,17		
Total	38	2594,20			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1,43160	97,39%	97,00%	96,28%

Coefficientes codificados



Término	Efecto	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	VIF
Constante		21,002	0,343	61,19	0,000	
Temperatura	12,177	6,089	0,337	18,04	0,000	1,00
Concentración	16,176	8,088	0,337	23,97	0,000	1,00
Temperatura*Temperatura	-3,612	-1,806	0,497	-3,63	0,001	1,17
Concentración*Concentración	-12,395	-6,197	0,497	-12,46	0,000	1,17
Temperatura*Concentración	8,067	4,033	0,413	9,76	0,000	1,00

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

Polifenoles totales = 21,002 + 6,089 Temperatura + 8,088 Concentración
 - 1,806 Temperatura*Temperatura -
 6,197 Concentración*Concentración
 + 4,033 Temperatura*Concentración

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	Polifenoles totales	Ajuste	Resid	Resid est.	
3	28,687	31,209	-2,521	-2,05	R
24	10,318	13,107	-2,789	-2,13	R

Residuo grande R

ANOVA unidireccional: 80°C - 0,05%; 80°C - 0,75%; 80°C - 1,45%; 42°C - 0,05%; ...

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
 Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores
 Factor 9 80°C - 0,05%; 80°C - 0,75%; 80°C - 1,45%; 42°C - 0,05%; 42°C - 0,75%; 42°C - 1,45%; 4°C - 0,05%; 4°C - 0,75%; 4°C - 1,45%

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	8	2559,25	319,906	274,55	0,000
Error	30	34,96	1,165		
Total	38	2594,20			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1,07945	98,65%	98,29%	98,00%



Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
80°C - 0,05%	3	6,237	1,100	(4,964; 7,509)
80°C - 0,75%	3	27,174	0,407	(25,901; 28,446)
80°C - 1,45%	3	30,049	1,309	(28,776; 31,322)
42°C - 0,05%	3	6,319	0,462	(5,046; 7,592)
42°C - 0,75%	15	20,989	1,314	(20,419; 21,558)
42°C - 1,45%	3	23,357	1,085	(22,084; 24,630)
4°C - 0,05%	3	3,981	0,291	(2,709; 5,254)
4°C - 0,75%	3	11,285	0,838	(10,012; 12,558)
4°C - 1,45%	3	11,661	0,353	(10,388; 12,933)

Desv.Est. agrupada = 1,07945

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
80°C - 1,45%	3	30,049	A
80°C - 0,75%	3	27,174	A
42°C - 1,45%	3	23,357	B
42°C - 0,75%	15	20,989	C
4°C - 1,45%	3	11,661	D
4°C - 0,75%	3	11,285	D
42°C - 0,05%	3	6,319	E
80°C - 0,05%	3	6,237	E
4°C - 0,05%	3	3,981	E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

A3. Análisis de superficie de respuesta – ABTS

Diseño central compuesto

Factores:	2	Réplicas:	3
Corridas base:	13	Total de corridas:	39
Bloques base:	1	Total de bloques:	1

Factorial de dos niveles: Factorial completo

Puntos del cubo:	12
Puntos centrales en el cubo:	15
Puntos axiales:	12
Puntos centrales en axial:	0

α : 1

Regresión de superficie de respuesta: ABTS vs. Temperatura; Concentración

Método

Filas no utilizadas 1

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	4	14360,6	3590,16	94,50	0,000
Lineal	2	10830,3	5415,15	142,53	0,000
Temperatura	1	3133,8	3133,77	82,48	0,000
Concentración	1	7696,5	7696,53	202,58	0,000
Cuadrado	1	1543,8	1543,76	40,63	0,000
Concentración*Concentración	1	1543,8	1543,76	40,63	0,000
Interacción de 2 factores	1	1666,6	1666,58	43,87	0,000
Temperatura*Concentración	1	1666,6	1666,58	43,87	0,000
Error	33	1253,8	37,99		
Falta de ajuste	4	955,7	238,93	23,25	0,000
Error puro	29	298,0	10,28		
Total	37	15614,4			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
6,16383	91,97%	91,00%	88,63%

Coefficientes codificados

Término	Efecto	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	VIF
Constante		42,24	1,35	31,40	0,000	
Temperatura	26,39	13,19	1,45	9,08	0,000	1,00
Concentración	42,63	21,31	1,50	14,23	0,000	1,00
Concentración*Concentración	-25,66	-12,83	2,01	-6,37	0,000	1,00
Temperatura*Concentración	23,57	11,78	1,78	6,62	0,000	1,00

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

ABTS = 42,24 + 13,19 Temperatura + 21,31 Concentración - 12,83 Concentración*Concentración + 11,78 Temperatura*Concentración

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	ABTS	Ajuste	Resid	Resid est.	
11	87,59	75,70	11,89	2,25	R
14	34,78	50,72	-15,94	-2,76	R
30	32,87	50,72	-17,85	-3,10	R

Residuo grande R

ANOVA unidireccional: 80°C - 1,45%; 80°C - 0,75%; 80°C - 0,05%; 42°C - 0,05%; ...

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
 Nivel de significancia $\alpha = 0,05$
 Filas no utilizadas 1

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	9	80°C - 1,45%; 80°C - 0,75%; 80°C - 0,05%; 42°C - 0,05%; 42°C - 0,75%; 42°C - 1,45%; 4°C - 0,05%; 4°C - 0,75%; 4°C - 1,45%

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	8	15316,4	1914,55	186,30	0,000
Error	29	298,0	10,28		
Total	37	15614,4			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
3,20575	98,09%	97,56%	96,69%

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
80°C - 1,45%	3	81,20	7,72	(77,42; 84,99)
80°C - 0,75%	3	51,80	3,32	(48,01; 55,58)
80°C - 0,05%	3	7,437	0,702	(3,651; 11,222)
42°C - 0,05%	3	11,964	0,837	(8,179; 15,750)
42°C - 0,75%	15	43,788	3,190	(42,095; 45,481)
42°C - 1,45%	2	33,825	1,347	(29,189; 38,461)
4°C - 0,05%	3	4,8672	0,1116	(1,0818; 8,6526)
4°C - 0,75%	3	24,908	0,529	(21,123; 28,694)
4°C - 1,45%	3	31,50	2,18	(27,71; 35,28)

Desv.Est. agrupada = 3,20575

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
80°C - 1,45%	3	81,20	A
80°C - 0,75%	3	51,80	B
42°C - 0,75%	15	43,788	C
42°C - 1,45%	2	33,825	D
4°C - 1,45%	3	31,50	D
4°C - 0,75%	3	24,908	D
42°C - 0,05%	3	11,964	E
80°C - 0,05%	3	7,437	E
4°C - 0,05%	3	4,8672	E

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

A4. Análisis de superficie de respuesta – ORAC

Diseño central compuesto

Factores: 2 Réplicas: 2
Corridas base: 13 Total de corridas: 26
Bloques base: 1 Total de bloques: 1

Factorial de dos niveles: Factorial completo

Puntos del cubo: 8
Puntos centrales en el cubo: 10
Puntos axiales: 8
Puntos centrales en axial: 0

α : 1

Regresión de superficie de respuesta: ORAC vs. Temperatura; Concentración

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	5	39683,8	7936,8	22,21	0,000
Lineal	2	37683,2	18841,6	52,72	0,000
Temperatura	1	90,2	90,2	0,25	0,621
Concentración	1	37593,0	37593,0	105,19	0,000
Cuadrado	2	1948,9	974,4	2,73	0,090
Temperatura*Temperatura	1	1466,7	1466,7	4,10	0,056
Concentración*Concentración	1	32,6	32,6	0,09	0,766
Interacción de 2 factores	1	51,8	51,8	0,14	0,707
Temperatura*Concentración	1	51,8	51,8	0,14	0,707
Error	20	7147,6	357,4		
Falta de ajuste	3	5784,7	1928,2	24,05	0,000
Error puro	17	1363,0	80,2		
Total	25	46831,5			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
18,9046	84,74%	80,92%	70,14%

Coefficientes codificados

Término	Efecto	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	VIF
Constante		97,87	5,55	17,63	0,000	
Temperatura	5,48	2,74	5,46	0,50	0,621	1,00
Concentración	111,94	55,97	5,46	10,26	0,000	1,00
Temperatura*Temperatura	-32,59	-16,29	8,04	-2,03	0,056	1,17
Concentración*Concentración	-4,86	-2,43	8,04	-0,30	0,766	1,17
Temperatura*Concentración	5,09	2,54	6,68	0,38	0,707	1,00

Ecuación de regresión en unidades no codificadas



ORAC = 97,87 + 2,74 Temperatura + 55,97 Concentración -
 16,29 Temperatura*Temperatura
 - 2,43 Concentración*Concentración + 2,54 Temperatura*Concentración

Ajustes y diagnósticos para observaciones poco comunes

Obs	ORAC	Ajuste	Resid	Resid	est.
17	102,94	151,41	-48,47	-2,95	R

Residuo grande R

ANOVA unidireccional: 80°C - 0,05%; 80°C - 0,75%; 80°C - 1,45%; 42°C - 0,05%; ...

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
 Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	9	80°C - 0,05%; 80°C - 0,75%; 80°C - 1,45%; 42°C - 0,05%; 42°C - 0,75%; 42°C - 1,45%; 4°C - 0,05%; 4°C - 0,75%; 4°C - 1,45%

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	8	136405	17050,7	181,41	0,000
Error	69	6485	94,0		
Total	77	142891			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
9,69473	95,46%	94,94%	94,13%

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
80°C - 0,05%	6	25,155	1,851	(17,260; 33,051)
80°C - 0,75%	6	59,21	4,44	(51,32; 67,11)
80°C - 1,45%	6	163,72	10,66	(155,83; 171,62)
42°C - 0,05%	6	47,07	5,14	(39,18; 54,97)
42°C - 0,75%	30	103,45	9,42	(99,91; 106,98)
42°C - 1,45%	6	115,94	14,74	(108,04; 123,83)
4°C - 0,05%	6	13,590	2,190	(5,694; 21,486)
4°C - 0,75%	6	76,07	9,40	(68,18; 83,97)
4°C - 1,45%	6	141,98	17,57	(134,09; 149,88)

Desv.Est. agrupada = 9,69473

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
80°C - 1,45%	6	163,72	A
4°C - 1,45%	6	141,98	B
42°C - 1,45%	6	115,94	C
42°C - 0,75%	30	103,45	C
4°C - 0,75%	6	76,07	D
80°C - 0,75%	6	59,21	D E
42°C - 0,05%	6	47,07	E
80°C - 0,05%	6	25,155	F
4°C - 0,05%	6	13,590	F

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

A6. Determinación del contenido fenólico – Folin-Ciocalteu

ANOVA unidireccional: Estrella Galicia; Damm 100P; Damm AB; 1906; Lúpulo Artesano; Malta Artesana

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	6	Estrella Galicia; Damm 100P; Damm AB; 1906; Lúpulo Artesano; Malta Artesana

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	5	371,37	74,275	21,65	0,000
Error	12	41,16	3,430		
Total	17	412,53			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1,85206	90,02%	85,86%	77,55%

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Estrella Galicia	3	38,83	2,97	(36,50; 41,16)



Damm 100P	3	30,86	2,46	(28,54; 33,19)
Damm AB	3	30,148	0,642	(27,819; 32,478)
1906	3	33,338	1,484	(31,008; 35,668)
Lúpulo Artesano	3	24,841	1,554	(22,511; 27,170)
Malta Artesana	3	36,517	0,808	(34,188; 38,847)

Desv.Est. agrupada = 1,85206

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Estrella Galicia	3	38,83	A
Malta Artesana	3	36,517	A B
1906	3	33,338	B C
Damm 100P	3	30,86	C
Damm AB	3	30,148	C
Lúpulo Artesano	3	24,841	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

A7. Determinación de la actividad antioxidante – ABTS

ANOVA unidireccional: Estrella Galicia; Damm 100P; Damm AB; 1906; Lúpulo Artesano; Malta Artesana

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
 Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	6	Estrella Galicia; Damm 100P; Damm AB; 1906; Lúpulo Artesano; Malta Artesana

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	5	2390,0	477,99	22,63	0,000
Error	12	253,4	21,12		
Total	17	2643,4			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
4,59541	90,41%	86,42%	78,43%



Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Estrella Galicia	3	87,95	2,12	(82,17; 93,73)
Damm 100P	3	66,81	3,08	(61,03; 72,59)
Damm AB	3	75,74	6,28	(69,96; 81,52)
1906	3	87,37	5,52	(81,58; 93,15)
Lúpulo Artesano	3	60,027	1,298	(54,246; 65,808)
Malta Artesana	3	90,51	6,41	(84,73; 96,29)

Desv.Est. agrupada = 4,59541

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Malta Artesana	3	90,51	A
Estrella Galicia	3	87,95	A B
1906	3	87,37	A B
Damm AB	3	75,74	B C
Damm 100P	3	66,81	C D
Lúpulo Artesano	3	60,027	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

A8. Determinación de la actividad antioxidante – ORAC

ANOVA unidireccional: Estrella Galicia; Damm 100P; Damm AB; 1906; Lúpulo Artesano; Malta Artesana

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	6	Estrella Galicia; Damm 100P; Damm AB; 1906; Lúpulo Artesano; Malta Artesana

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	5	9749	1949,9	18,33	0,000
Error	12	1277	106,4		
Total	17	11026			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
10,3150	88,42%	83,60%	73,95%

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Estrella Galicia	3	125,37	15,76	(112,39; 138,34)
Damm 100P	3	120,18	11,19	(107,21; 133,16)
Damm AB	3	145,522	1,447	(132,546; 158,497)
1906	3	165,40	7,18	(152,43; 178,38)
Lúpulo Artesano	3	152,58	8,24	(139,60; 165,56)
Malta Artesana	3	188,61	11,96	(175,64; 201,59)

Desv.Est. agrupada = 10,3150

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Malta Artesana	3	188,61	A
1906	3	165,40	A B
Lúpulo Artesano	3	152,58	B C
Damm AB	3	145,522	B C D
Estrella Galicia	3	125,37	C D
Damm 100P	3	120,18	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

A9. Emulsiones

ANOVA unidireccional: Control; Extracto BSG; Film (cara lisa); Film (cara rugosa)

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$
Filas no utilizadas	150

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Control; Extracto BSG; Film (cara lisa); Film (cara rugosa)

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	17771,2	5923,7	47,76	0,000
Error	6	744,1	124,0		

Total 9 18515,4

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
11,1364	95,98%	93,97%	86,97%

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Control	3	111,37	12,69	(95,64; 127,10)
Extracto BSG	3	3,347	0,419	(-12,386; 19,080)
Film (cara lisa)	2	69,3	15,9	(50,0; 88,5)
Film (cara rugosa)	2	66,22	13,00	(46,95; 85,49)

Desv.Est. agrupada = 11,1364

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Control	3	111,37	A
Film (cara lisa)	2	69,3	B
Film (cara rugosa)	2	66,22	B
Extracto BSG	3	3,347	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Valor p	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T
Diferencia de niveles ajustado				
Extracto BSG - Control 0,000	-108,02	9,09	(-139,53; -76,52)	-11,88
Film (cara l - Control 0,023	-42,1	10,2	(-77,3; -6,9)	-4,14
Film (cara r - Control 0,017	-45,1	10,2	(-80,4; -9,9)	-4,44
Film (cara l - Extracto BSG 0,003	65,9	10,2	(30,7; 101,1)	6,48
Film (cara r - Extracto BSG 0,003	62,9	10,2	(27,7; 98,1)	6,18
Film (cara r - Film (cara l 0,992	-3,0	11,1	(-41,6; 35,5)	-0,27

Nivel de confianza individual = 98,66%

A10. Proteínas

ANOVA unidireccional: Estrella Galicia; Damm 100P; Damm AB; 1906; Lúpulo Artesano; Malta Artesana

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
 Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor Niveles Valores
 Factor 6 Estrella Galicia; Damm 100P; Damm AB; 1906; Lúpulo Artesano;
 Malta Artesana

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	5	521,516	104,303	182,25	0,000
Error	12	6,868	0,572		
Total	17	528,383			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,756508	98,70%	98,16%	97,08%

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Estrella Galicia	3	20,832	0,751	(19,880; 21,783)
Damm 100P	3	24,563	1,133	(23,611; 25,514)
Damm AB	3	22,832	0,282	(21,880; 23,784)
1906	3	21,977	0,997	(21,025; 22,928)
Lúpulo Artesano	3	8,5107	0,1093	(7,5591; 9,4624)
Malta Artesana	3	16,506	0,708	(15,554; 17,458)

Desv.Est. agrupada = 0,756508

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Damm 100P	3	24,563	A
Damm AB	3	22,832	A B
1906	3	21,977	B
Estrella Galicia	3	20,832	B
Malta Artesana	3	16,506	C
Lúpulo Artesano	3	8,5107	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

A11. Cuantificación de ácido ferúlico

ANOVA unidireccional: Estrella Galicia; Damm 100P; Damm AB; 1906; Malta artesana

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna Por lo menos una media es diferente
 Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	5	Estrella Galicia; Damm 100P; Damm AB; 1906; Malta artesana

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	4	27903	6975,8	18,27	0,001
Error	7	2673	381,8		
Total	11	30576			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
19,5395	91,26%	86,26%	70,25%

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Estrella Galicia	2	156,6	40,6	(123,9; 189,2)
Damm 100P	3	257,5	18,8	(230,8; 284,2)
Damm AB	3	290,89	10,15	(264,21; 317,56)
1906	2	217,17	7,33	(184,50; 249,84)
Malta artesana	2	188,74	7,66	(156,07; 221,41)

Desv.Est. agrupada = 19,5395

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Damm AB	3	290,89	A
Damm 100P	3	257,5	A B
1906	2	217,17	B C
Malta artesana	2	188,74	C



Estrella Galicia 2 156,6 C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo B. Rectas de calibrado

B1. Folin-Ciocalteu

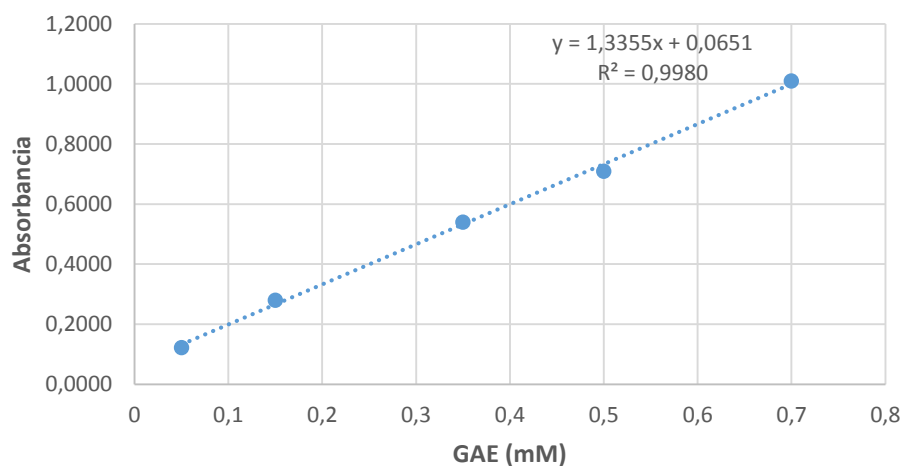


Figura 38. Recta de calibrado del método Folin-Ciocalteu.

B2. ABTS

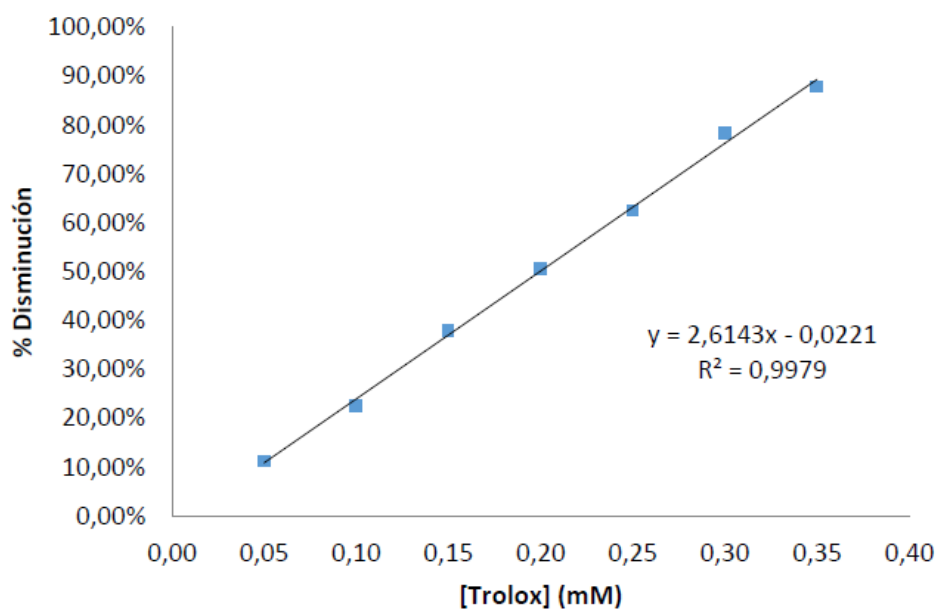


Figura 39. Recta de calibrado del método ABTS.

B3. ORAC

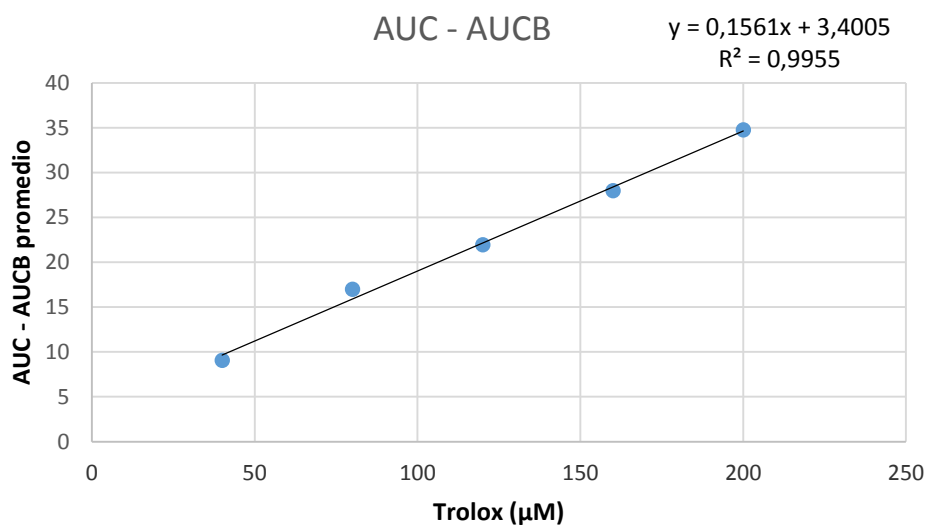


Figura 40. Recta de calibrado del método ORAC.

B4. Ácido ferúlico

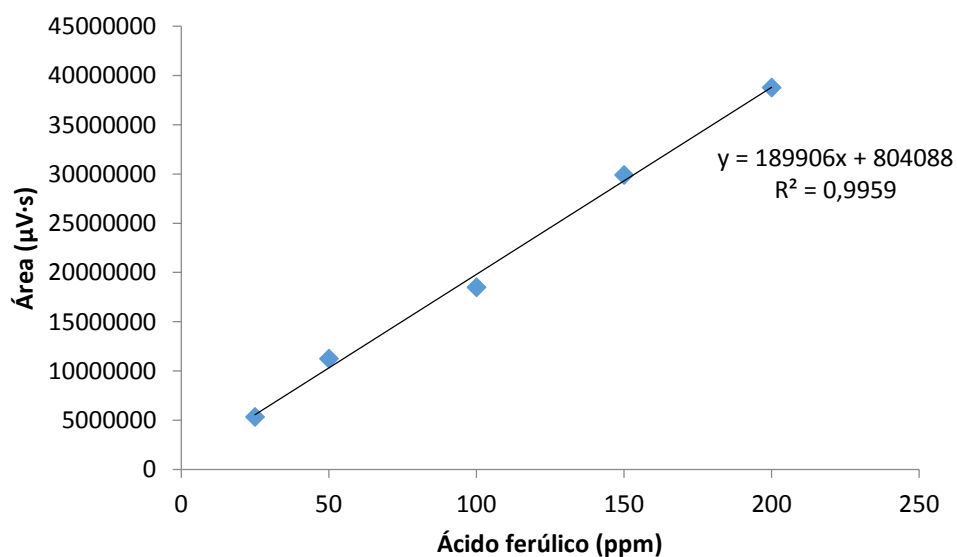


Figura 41. Recta de calibrado del HPLC-DAD para el ácido ferúlico.

B5. Proteínas

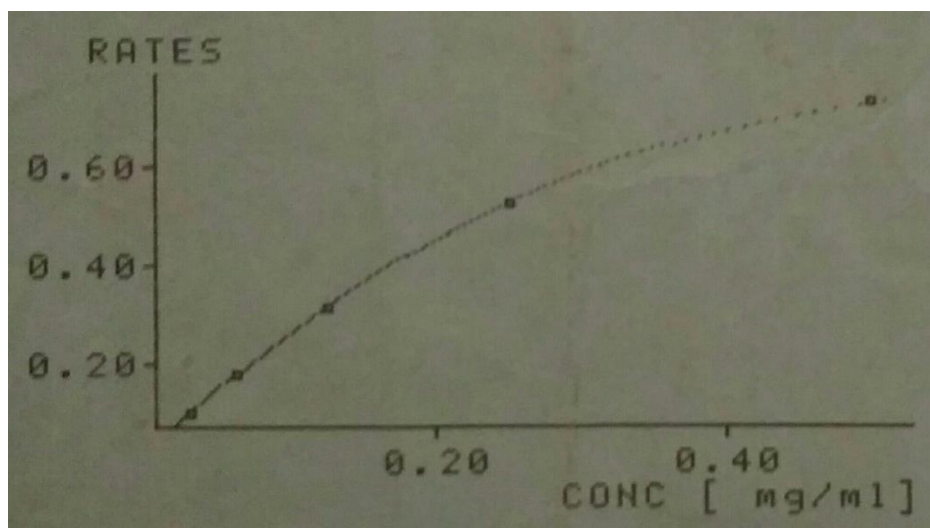


Figura 42. Curva de calibrado para la detección de proteínas.

Anexo C. Cromatogramas

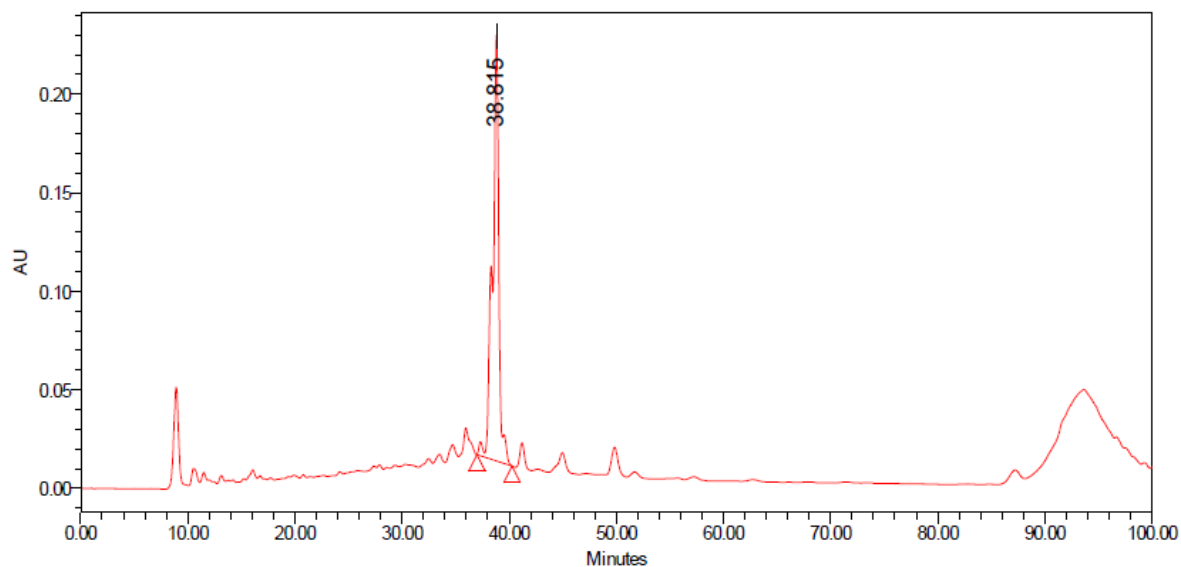


Figura 43. Cromatograma a 280 nm del extracto de Estrella Galicia.

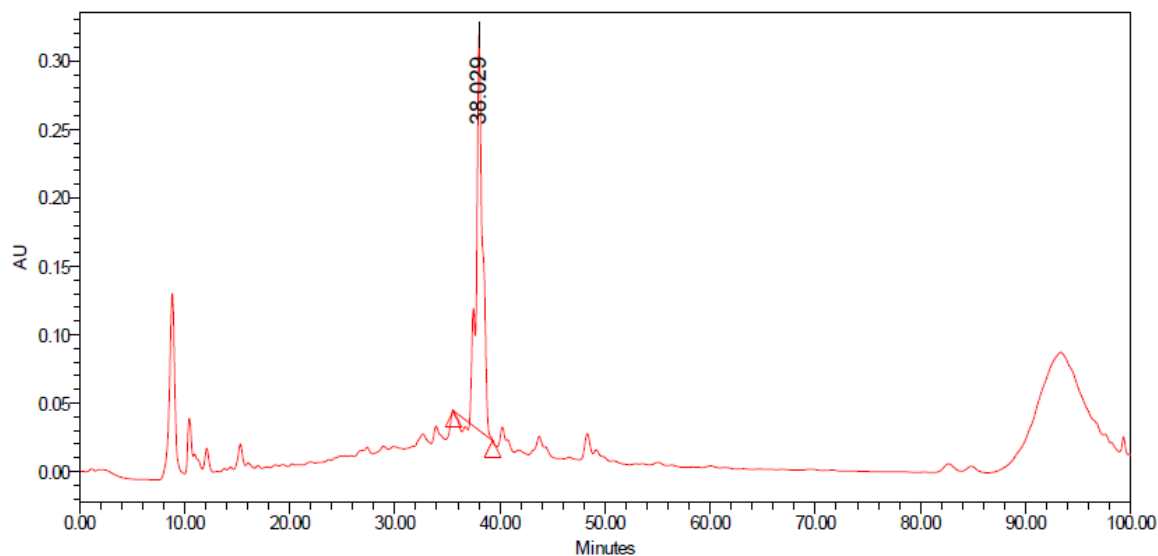


Figura 44. Cromatograma a 280 nm del extracto de Damm100P.

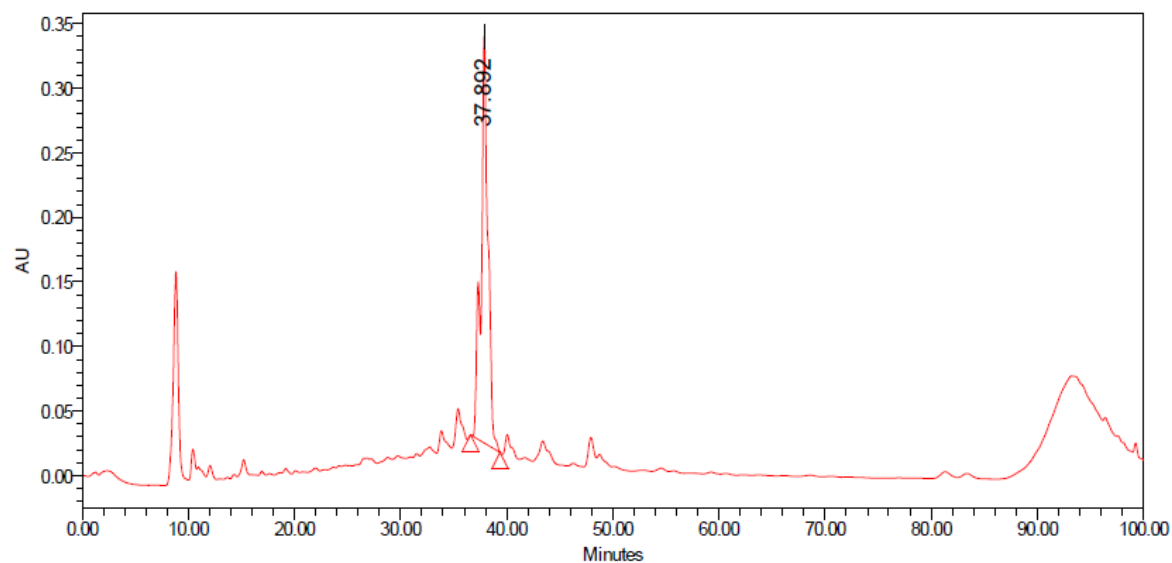


Figura 45. Cromatograma a 280 nm del extracto de DammAB.

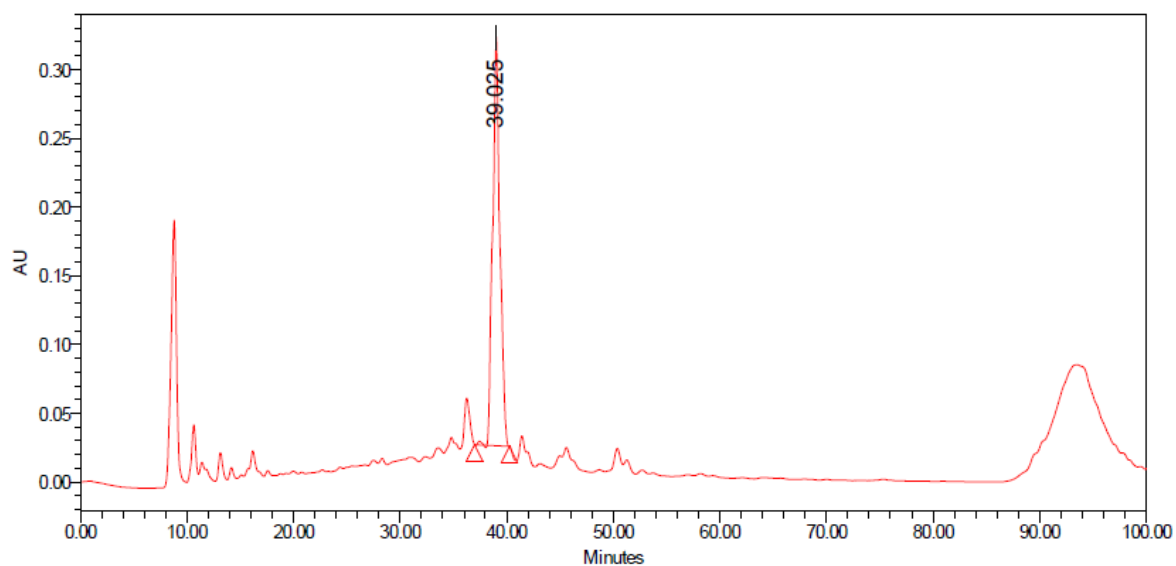


Figura 46. Cromatograma a 280 nm del extracto de 1906.

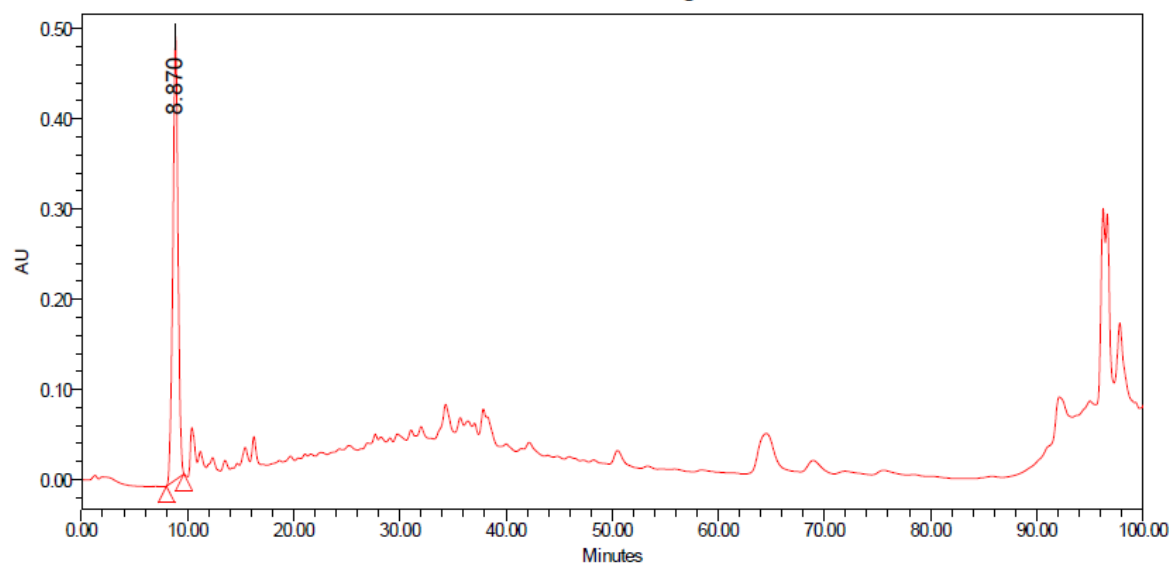


Figura 47. Cromatograma a 280 nm del extracto de Lúpulo Artesano.

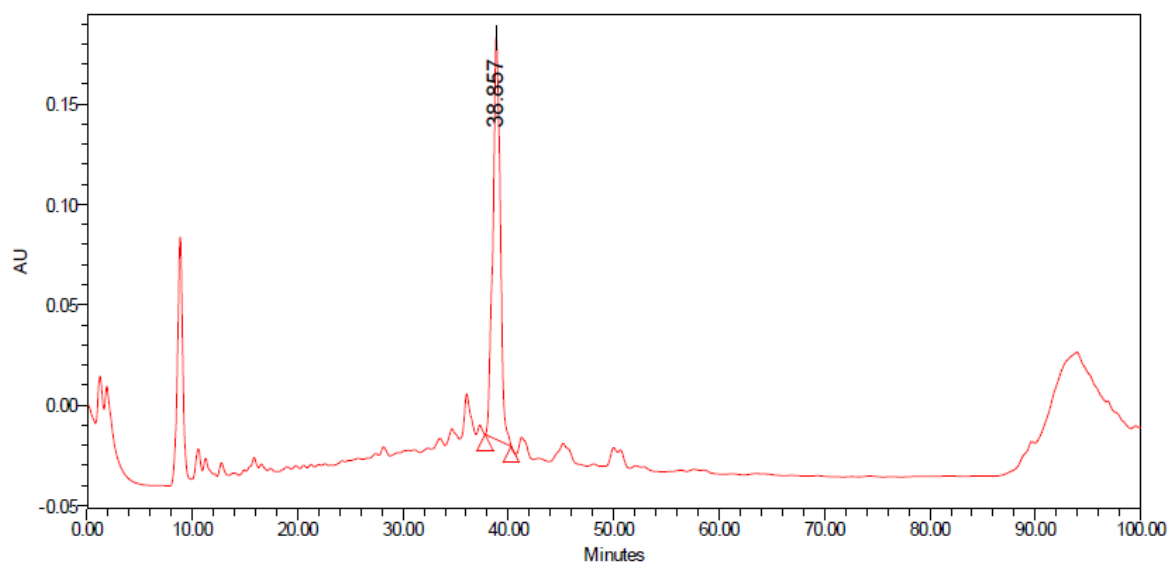


Figura 48. Cromatograma a 280 nm del extracto de Malta Artesana.